

Tef1 ist ein multifaktorielles Protein von *Candida albicans* und moduliert die angeborene und adaptive Immunreaktion

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc.

Justus Linden

geboren am 27. Juli 1987 in Engelskirchen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter Zipfel

Abteilung Infektionsbiologie

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut

Beutenbergstr. 11a

07745 Jena

2. Prof. Dr. Berit Jungnickel

Zentrum für Molekulare Biomedizin

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Hans-Knöll-Str. 2

07745 Jena

3. Prof. Dr. Rudolf Manz

Institut für systemische Entzündungsforschung

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23562 Lübeck

Datum der öffentlichen Disputation:

19. Mai 2017

Zusammenfassung.....	VI
Summary.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Immunsystem.....	1
1.1.1. Überblick.....	1
1.1.2. Angeborenes Immunsystem.....	1
1.1.3. Adaptives Immunsystem.....	2
1.2. Komplementsystem.....	4
1.2.1. Komplementkaskade.....	4
1.2.2. Komplementregulatoren.....	7
1.2.3. Effektorfunktionen des Komplementsystems.....	11
1.2.4. Komplement und das adaptive Immunsystem.....	12
1.3. B-Zellen.....	13
1.3.1. B-Zell-Entwicklung.....	13
1.3.2. B-Zell-Aktivierung.....	15
1.3.3. Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors.....	17
1.3.4. Signaltransduktion des B-Zell-Corezeptorkomplexes.....	19
1.3.5. Zytokinproduktion durch B-Zellen.....	19
1.3.6. Regulatorische B-Zellen.....	20
1.3.7. Evasion der B-Zell-Immunantwort.....	21
1.4. <i>Candida albicans</i>	23
1.4.1. Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>	23
1.4.2. Komplementevasion von <i>C. albicans</i>	25
1.4.3. Evasion der zellulären Immunreaktionen.....	26
1.4.4. Humorale Immunreaktion auf <i>C. albicans</i>	26
1.5. Translation elongation factor 1 (Tef1).....	27
2. Fragestellung.....	29
3. Material und Methoden.....	30
3.1. Material.....	30
3.1.1. Medien.....	30
3.1.2. Puffer.....	31
3.1.3. Chemikalien.....	34
3.1.4. Antikörper/-seren.....	36
3.1.5. Sonstiges.....	38
3.2. Methoden.....	39
3.2.1. Mikrobiologische Arbeiten.....	39

3.2.2.	Proteinbiochemische Arbeiten.....	40
3.2.3.	Zellkultur	42
3.2.4.	Immunfluoreszenz.....	44
3.2.5.	Durchflusszytometrie.....	45
3.2.6.	Funktionale Studien.....	46
3.2.7.	Statistische Analysen	49
4.	Ergebnisse.....	50
4.1.	Faktor H bindet an Tef1 und Tef1-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität	50
4.2.	Die Komplementregulatoren FHL-1, CFHR1, C4BP und Properdin binden an Tef1.....	52
4.3.	Tef1 wird auf der Zelloberfläche von <i>C. albicans</i> exprimiert.....	53
4.4.	Tef1 wird sezerniert und bindet an die Zelloberfläche von <i>C. albicans</i>	55
4.5.	Tef1 rekrutiert die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen an die Zelloberfläche von <i>C. albicans</i>	56
4.6.	An die Oberfläche von <i>C. albicans</i> rekrutiertes Plasmin schädigt Endothelzellen ...	58
4.7.	Tef1-gebundene Komplementregulatoren inhibieren die komplementabhängige Deposition von C3b und die Phagozytose durch humane neutrophile Granulozyten.....	59
4.8.	Tef1 bindet die Komplementproteine C3dg und C3d, nicht aber C3b	60
4.9.	Tef1 hat keinen Einfluss auf die Bindung von CR2 an C3d.....	61
4.10.	Tef1 bindet den Komplementrezeptor 2 und teilt die Bindungsdomäne mit C3d ..	62
4.11.	Tef1 bindet an den CR2-Rezeptor auf Raji-Zellen.....	63
4.12.	Tef1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der Proteinkinasen CD19 in Raji-Zellen.....	65
4.13.	Tef1 bindet an primäre Leukozyten.....	66
4.14.	Tef1 induziert die Produktion von IL-10 in PBMCs	67
4.15.	Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs	69
4.16.	Tef1 bindet an primäre B-Zellen via CR2	71
4.17.	Tef1 induziert die Produktion von IL-10 in B-Zellen.....	72
4.18.	Tef1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen	74
4.19.	Tef1 induziert die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen	76
4.20.	Tef1-induzierte B-Zellen inhibieren die Proliferation von T-Zellen	78
5.	Diskussion.....	80
5.1.	Tef1 ist ein CRASP und vermittelt die Komplementevasion von <i>Candida albicans</i> ..	80
5.2.	Tef1 bindet an Raji-Zellen über den Komplementrezeptor 2.....	84
5.3.	Tef1 moduliert die Aktivierung von Immunzellen	86
5.4.	Tef1 induziert die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen	89
6.	Literaturverzeichnis	94

Abkürzungsverzeichnis	108
Abbildungsverzeichnis	112
Tabellenverzeichnis	113
Eigenständigkeitserklärung.....	114
Lebenslauf	115
Übersicht der Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikationen	116
Danksagung.....	118

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals auf zellulärer Ebene der Beitrag eines einzelnen Oberflächenproteins auf die Komplement- und Immunevasion von *Candida albicans* gezeigt. Tef1 (*Translation Elongation Factor 1*) ist ein *moonlighting*-Protein von *C. albicans*. Es wird auf der Zelloberfläche exprimiert, sezerniert und ist zudem als Translationsfaktor im Zytoplasma lokalisiert. An der Zelloberfläche fungiert Tef1 als CRASP (*complement regulator acquiring surface protein*). Die durch Tef1 an die Oberfläche von *C. albicans* rekrutierten Komplementregulatoren tragen zur Komplement- und damit zur Evasion der angeborenen Immunantwort bei. Tef1 agiert sowohl – als CRASP – direkt am Ort der Expression als auch – als sezerniertes Protein – entfernt von der Pilzzelloberfläche. Dabei bindet Tef1 an Zellen und Komponenten des angeborenen Immunsystems und beeinflusst weiterhin das adaptive Immunsystem, insbesondere B-Zellen. Zum einen bindet Tef1 an B-Zellen und induziert die Produktion von IL-10 und damit eines anti-inflammatorischen Zytokins. Zum anderen verstärkt Tef1 die Differenzierung von B-Zellen, und es werden vermehrt Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp gebildet. Die Induktion von regulatorischen B-Zellen (B_{regs}) stellt einen neuartigen Immunevasionsmechanismus von *C. albicans* dar und wurde zuvor für bakterielle, virale und parasitäre Pathogene, nicht jedoch für pathogene Pilze beschrieben. Mit Tef1 wird in der vorliegenden Arbeit erstmals der Virulenzfaktor eines Pathogens als Modulator der B-Zell-Differenzierung identifiziert. Die Tef1-induzierten regulatorischen B-Zellen inhibieren die Proliferation von T-Zellen und beeinflussen so das Gleichgewicht des adaptiven Immunsystems. Auf diese Weise ermöglicht Tef1 die Persistenz des Erregers. Dieser distinkte, auf die humorale Immunevasion ausgerichtete Mechanismus betont die Rolle der humoralen Immunantwort bei Pilzinfektionen. Insgesamt ist Tef1 ein multifaktorielles Immunevasionsprotein von *C. albicans*. Seine *moonlighting*-Charakteristik als Oberflächen- und sezerniertes Protein erlaubt es Tef1, sowohl die angeborene (Komplementkaskade) als auch die adaptive Immunantwort (B-Zellen) zu modulieren. Somit ermöglicht Tef1 auf mannigfaltige Weise die Persistenz von *C. albicans* im menschlichen Organismus.

Summary

In the present study, the contribution of a distinct surface protein to complement and immune evasion of *Candida albicans* is shown for the first time. Tef1 (*Translation Elongation Factor 1*) is a moonlighting protein of *C. albicans*. It is expressed on the cell surface, actively secreted by the fungus and furthermore a translation elongation factor in the cytoplasm. On the cell surface, Tef1 is a CRASP (*complement regulator acquiring surface protein*). Tef1 recruits complement regulators to the cell surface and these regulators contribute to complement evasion and evasion of the innate immune reaction. Tef1 acts – as a CRASP – directly at the site of expression and furthermore – as a secreted protein – remotely from the fungal cell. Soluble Tef1 binds to cells and components of the innate immune system and also influences cells of the adaptive immune system, particularly B cells. On the one hand, Tef1 binds to B cells and induces the production of anti-inflammatory IL-10. On the other hand, Tef1 amplifies the differentiation of B cells, resulting in the formation of plasmablasts with regulatory phenotype. The induction of regulatory B cells (B_{regs}) is a novel immune evasion mechanism of *C. albicans* and parallels mechanisms previously described for bacteria, viruses and parasites. However, the induction of regulatory B cells has so far not been described for fungal pathogens. In the present study, Tef1 is identified as the first protein virulence factor of a pathogen that modulates the differentiation of B cells. Tef1-induced regulatory B cells inhibit the proliferation of T cells and thus influence the balance of the adaptive immune reaction. To this end, Tef1 might contribute to the persistence of *C. albicans* in the host organism. This immune evasion mechanism targeting the humoral immune response emphasizes the role of the humoral immune response in fungal infections.

Taken together, Tef1 is a multifactorial immune evasion protein of *C. albicans*. Its moonlighting characteristics allow Tef1 to modulate the innate immune reaction (complement system) as well as the adaptive immune reaction (B cells). Thus, Tef1 contributes to the persistence of *C. albicans* in the human organism in a manifold manner.

1. Einleitung

1.1. Immunsystem

1.1.1. Überblick

Zur Abwehr eingedrungener Mikroorganismen, Beseitigung körperfremden Materials sowie entarteter oder beschädigter Körperzellen verfügt der menschliche Organismus über eine Reihe von Organen, zellulären und molekularen Komponenten, die zusammen das komplexe Netzwerk des Immunsystems bilden. Alle Teile des Immunsystems agieren konzertiert und hocheffizient, um den Organismus zu schützen. Hauptaufgabe ist dabei die immunologische Erkennung von Fremd- und entarteten Strukturen und letztlich deren Eliminierung. Darüber hinaus erfordert das immunologische Netzwerk präzise Regulationsmechanismen, um einerseits die Immunreaktion nach Beseitigung des auslösenden Agens herunter zu regulieren und andererseits überschießende und autoimmunologische Reaktionen zu vermeiden.

Die Wichtigkeit des Immunsystems für einen Organismus lässt sich daran erkennen, dass schon evolutionär frühe Organismen über ein Immunsystem verfügen; es ist ein früh entstandenes und evolutionär hoch konserviertes System.

Das Immunsystem wird klassischerweise unterschieden in *angeborenes* und *adaptives* Immunsystem [1].

1.1.2. Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem erhält seinen Namen dadurch, dass seine zur Erkennung von Fremdstrukturen (Antigenen) existierenden Komponenten allesamt in der Keimbahn codiert und somit „angeboren“ sind. Aus diesem Grund sind die Antigenspezifitäten des angeborenen Immunsystems nicht variabel. Jedoch erkennen die im Genom codierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, *PRR*) des angeborenen Immunsystems ein breites Spektrum von ca. 10^3 Strukturen. Damit ist das angeborene Immunsystem in der Lage, einen Großteil eindringender Erreger zu erkennen und bereits in einem frühen Stadium der Infektion zu eliminieren. Darüber hinaus werden sowohl apoptotisches und nekrotisches Zellmaterial erkannt und beseitigt. Die Spezifität der PRRs folgt nicht der Unterscheidung zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“. Vielmehr erkennen PRRs spezifisch MAMPs (*microbe-associated molecular pattern*) und DAMPs (*damage/danger-associated molecular pattern*). Während MAMPs charakteristisch für körperfremde Mikroorganismen sind (Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten), stellen DAMPs körpereigene Strukturen dar, die jedoch normalerweise nicht im extrazellulären Raum anzutreffen sind (z.B. Proteine, die in Folge von Zellschäden freigesetzt wurden) [2]. MAMPs und DAMPs ist gemein, dass sie charakteristisch für gefährliche, den Körper schädigende Ereignisse sind [3].

Bereits bevor ein Krankheitserreger in den menschlichen Körper eindringen kann, muss er eine Reihe von physischen (Haut, Schleimhäute) und chemischen Barrieren (antimikrobielle Peptide, Lysozym, Schleim, Magensäure) überwinden. Sind diese Barrieren überwunden, wird der Erreger unverzüglich von Zellen des angeborenen Immunsystems bekämpft. Dies sind vor allem Phagozyten wie neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen, welche die Erreger aktiv aufnehmen (phagozytieren) und im Zellinnern zerstören. Fragmente des zerstörten Erregers werden an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) exprimiert und dort von Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt. Zu den APCs zählen neben den genannten dendritischen Zellen und Makrophagen außerdem Monozyten und B-Lymphozyten.

Die Phagozyten des angeborenen Immunsystems verfügen weiterhin über die Eigenschaft, antimikrobielle Substanzen ausschütten zu können und so Mikroorganismen zu schädigen. Diese Eigenschaft findet sich ebenfalls bei NK-Zellen (*natural killer cells*) und Mastzellen. In Folge des Antigenkontakts produzieren die Phagozyten außerdem Zytokine, die der Rekrutierung weiterer Phagozyten sowie Zellen des adaptiven Immunsystems dienen. Letztere erhalten durch die Zytokine weiterhin costimulierende Signale zum Aufbau der adaptiven Immunantwort [3].

Neben den zellulären umfasst das angeborene Immunsystem auch humorale (lösliche) Komponenten. Hierzu zählen insbesondere das Komplementsystem, das Kininsystem und die Koagulationskaskade. Das Komplementsystem ist eine Proteinkaskade, die zur Opsonisierung von Fremdkörpern führt und so deren Phagozytose vermittelt. Darüber hinaus resultiert die Komplementkaskade in der Zerstörung der Zellmembran von Mikroorganismen, wodurch diese abgetötet werden.

Von zentraler Bedeutung für das angeborene Immunsystem ist die Geschwindigkeit, mit der es auf Fremdstoffe und Mikroorganismen reagiert. Die beschriebenen Mechanismen des angeborenen Immunsystems laufen innerhalb weniger Stunden nach der Antigenexposition ab. Dadurch ist das angeborene Immunsystem in der Lage, die meisten Infektionen frühzeitig zu erkennen und erfolgreich zu bekämpfen [3].

1.1.3. Adaptives Immunsystem

Das adaptive oder auch erworbene Immunsystem ist dadurch charakterisiert, dass es sich zunächst an das zu bekämpfende Antigen anpassen (adaptieren) bzw. eine Antigenspezifität „erwerben“ muss. Dieser Teil des Immunsystems ist evolutionär jünger als das angeborene Immunsystem und entstand im Laufe der Vertebratenentwicklung. Die charakteristischen Zellen des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. Die Flexibilität und Vielfäl-

tigkeit des adaptiven Immunsystems liegt darin begründet, dass während der Lymphozytenreifung die genetischen Informationen, welche die Spezifität der Antigen-erkennenden Rezeptoren festlegen, durch Rekombination zu immer neuen Permutationen zusammengefügt werden. Auf diese Weise entsteht eine enorme Vielfalt von Lymphozyten-Zellklonen, von denen jeder einen einzigartigen Antigenrezeptor exprimiert [3].

B- und T-Lymphozyten nehmen jeweils unterschiedliche Aufgaben in der adaptiven Immunantwort wahr. B-Lymphozyten binden ihr spezifisches Antigen über den B-Zell-Rezeptor (*B-cell receptor, BCR*), der eine membrangebundene Form eines Antikörpers (Immunglobulins) darstellt. Über diesen werden B-Lymphozyten aktiviert und durchlaufen einen Differenzierungsprozess hin zu Plasmazellen. Diese Zellen produzieren große Mengen von Antikörpern, welche die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems ausmachen [4].

T-Lymphozyten exprimieren den T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor, TCR*), der sich strukturell von den verwandten Immunglobulinen unterscheidet. Durch Antigenkontakt aktiviert, differenzieren T-Lymphozyten in T-Effektor-Lymphozyten. Hierbei werden drei Klassen unterschieden: 1) Zytotoxische T-Zellen (*Cytotoxic T-Lymphocytes, CTL*), die z.B. virusinfizierte Körperzellen abtöten. 2) T-Helferzellen (*Helper T cells, Th cells*), die costimulierende Effekte auf andere Immunzellen ausüben, insbesondere B-Zellen, und so deren Aktivierung und Effektorfunktionen unterstützen. 3) Regulatorische T-Zellen (*regulatory T-cells, T_{regs}*), welche die Aktivität anderer Immunzellen dämpfen und auf diese Weise das Immunsystem im Gleichgewicht halten [4, 5].

Im Gegensatz zur unmittelbaren Reaktion des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion entfaltet das adaptive Immunsystems erst nach einigen Tagen seine Wirkung. Wird eine Infektion nicht vom angeborenen Immunsystem beseitigt, muss eine Zelle des adaptiven Immunsystems mit entsprechender Spezifität zunächst mit dem Erreger in Kontakt gebracht werden. Dies erfordert einige Zeit. Antigenpräsentierende Zellen oder eindringende Pathogenzellen werden von der Infektionsstelle über das Lymphsystem abgeführt und sammeln sich in Lymphknoten. Dort befinden sich naive Lymphozyten, welche nun mit den Antigenen in Kontakt kommen. Die Lymphozyten werden aktiviert, differenzieren in Effektor-Lymphozyten und proliferieren. In der Folge verteilen sich die differenzierten Lymphozyten über das Lymphsystem und den Blutkreislauf im ganzen Körper, wo sie ihre Effektorfunktionen wahrnehmen und den Erreger bekämpfen [3].

Nach Beseitigung der die Immunreaktion auslösenden Antigene stirbt der Großteil der Lymphozyten nach Ablauf ihrer Lebensspanne in Folge ausbleibender Antigenstimuli ab. Ein kleiner Teil der Effektor-Lymphozyten differenziert jedoch in langlebige Gedächtniszellen, welche auch ohne Antigenstimuli überdauern können. Diese werden im Falle einer erneuten Infektion rasch aktiviert und vermitteln so einen langanhaltenden immunologischen Schutz [3].

1.2. Komplementsystem

Ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem. Diese Proteinkaskade setzt sich aus über 50 löslichen Faktoren zusammen, die in einer präzise orchestrierten Abfolge miteinander interagieren und eine Reihe von Effektorfunktionen ausüben. Die Bezeichnung „Komplement“ stammt von Paul Ehrlich (um 1890), der damit eine zu dieser Zeit nicht näher bekannte Komponente des Serums beschrieb, welche die zelluläre Immunreaktion ergänze („komplementiere“). In der Folge wurde das Komplementsystem als eine Proteinkaskade charakterisiert, welche zur Opsonisierung von Pathogenen führt und damit deren Phagozytose und Zerstörung verstärkt [3]. Diese Charakterisierung wurde mit der Zeit um eine Reihe weiterer Merkmale ergänzt. So wurde gezeigt, dass Komplement selbst die Zerstörung von Mikroorganismen vermitteln kann, indem es deren Zellwand durchbricht [6]. Weiterhin erstreckt sich die Wirkung des Komplementsystems nicht ausschließlich auf körperfremde Zellen, sondern es nimmt eine aktive Rolle in der Markierung und Eliminierung von Zelltrümmern apoptotischer und nekrotischer Zellen wahr [7]. Die Proteine des Komplementsystems werden hauptsächlich in der Leber, aber auch von nahezu allen anderen Zellen des Organismus gebildet und sind auch in immunprivilegierten Räumen wie Auge und Gehirn anzutreffen. Die Produktion von Komplementproteinen wird während der Immunreaktion verstärkt [8]. Neuere Studien zeigen, dass Komplementproteine über spezifische, bereits länger bekannte Rezeptoren mit Immunzellen interagieren und deren Aktivität beeinflussen [9, 10]. Somit ist heute klar, dass das Komplementsystem eine Schlüsselrolle in der Steuerung der gesamten Immunantwort einnimmt.

1.2.1. Komplementkaskade

Das Komplementsystem ist eine selbstverstärkende Proteinkaskade, die auf verschiedenen Wegen aktiviert werden kann. Dies sind der alternative Weg, der klassische Weg und der Lektin-Weg. Alle diese drei Aktivierungswege münden in der Bildung einer C3-Konvertase, ferner einer C5-Konvertase und schließlich des Membranangriffskomplexes (*membrane attack complex*, MAC oder auch *terminal complement complex*, TCC).

Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Opsonisierung von Krankheitserregern mit C3b und vermittelt so deren Phagozytose. Weiterhin werden im Verlauf der Komplementkaskade Anaphylatoxine wie C3a und C5a gebildet, die als lösliche Faktoren die Immunreaktion anderer Zellen modulieren. Schließlich zerstört der TCC Erregerzellen direkt, indem er die Zellmembran penetriert (Abbildung 1.1) [11].

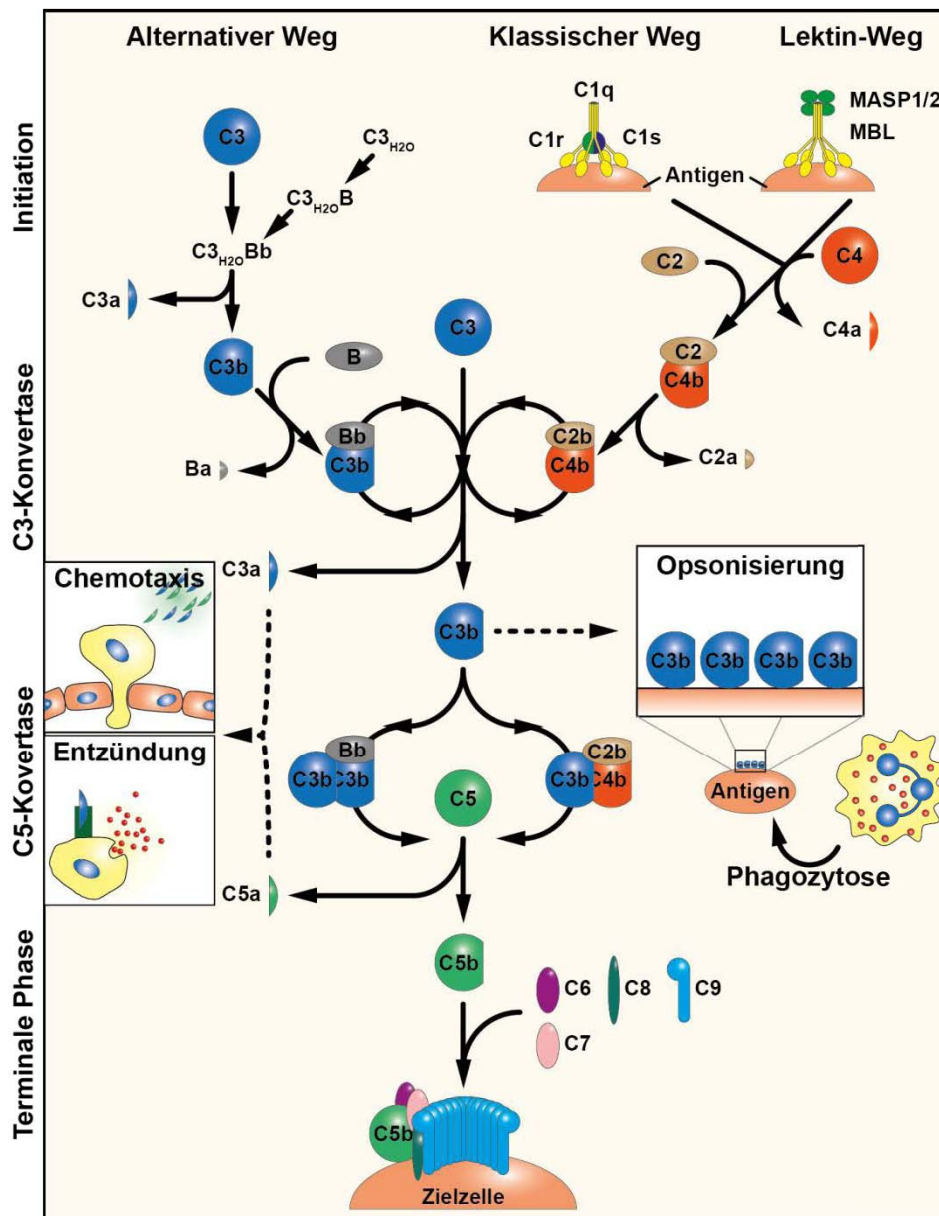


Abbildung 1.1: Das humane Komplementsystem

Das Komplementsystem ist zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Der kaskadenartige Ablauf der Komplementaktivierung wird in vier Stufen unterteilt: Initiation, Formierung der C3-Konvertase, Formierung der C5-Konvertase und terminale Phase. Die Komplementkaskade wird auf drei verschiedenen Wegen initiiert. Dies sind (v.l.n.r.) der alternative Weg, der klassische Weg und der Lektin-Weg. Alle diese drei Aktivierungswege münden in der Bildung einer C3-Konvertase und in der Folge der C5-Konvertase. Durch die C5-Konvertase gebildetes C5b ist das Ausgangsprotein für den Membranangriffskomplex (*membrane attack complex*, MAC oder auch *terminal complement complex*, TCC), welcher zur Lyse der Zielzelle führt. Durch die C3-Konvertase gebildetes C3b fungiert als Opsonin auf Zielstrukturen. C3a und von der C5-Konvertase gebildetes C5a sind potente Anaphylatoxine.

Aktivierung/Initiierung

Bei der Aktivierung der Komplementkaskade werden drei Wege unterschieden.

Der alternative Weg

Im Gegensatz zu klassischem und Lektin-Weg findet die Aktivierung des alternativen Wegs nicht an einer Oberfläche, sondern in fluider Phase statt. Von zentraler Bedeutung ist das Protein C3. Dieses wird zu einem geringen Grad spontan hydrolysiert und bildet C3_{H2O} [12]. An C3_{H2O} bindet Faktor B, welcher daraufhin von der Protease Faktor D gespalten wird, sodass eine initiale C3-Konvertase entsteht (C3_{H2O}Bb). Diese spaltet weiteres C3 in C3b und C3a. Wie auch im Fall von C4b wird durch diese Spaltung eine reaktive Thioestergruppe in C3b freigelegt. Findet die spontane Spaltung von C3 in der Nähe von Oberflächen statt, bindet C3b über die Thioestergruppe kovalent an die Oberfläche. C3b rekrutiert wiederum Faktor B, welches durch Faktor D gespalten wird und somit eine oberflächengebundene C3-Konvertase bildet (C3bBb) [9, 13]. Faktor P (Properdin) bindet an die C3-Konvertase des alternativen Wegs und stabilisiert den Komplex (C3bBbP) [14]. Weiterhin fungiert Properdin als ein Mustererkennungsprotein (*pattern recognition molecule*, *PRM*) und initialisiert die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Wegs direkt [15].

Der klassische Weg

Wurden Antigene (körperfremde wie auch körpereigene) durch IgG oder IgM gebunden, bindet das Protein C1q an die Antigen-Antikörper-Komplexe [16]. Darüber hinaus ist C1q auch ein PRM und bindet direkt an bakterielle [17] oder apoptotische Antigene [18]. C1q ist Bestandteil des C1-Komplexes, der darüber hinaus aus C1s und C1r (je zwei Proteine) besteht und insgesamt eine Masse von ca. 800 kDa besitzt [19]. Bindet der C1-Komplex über C1q an ein Antigen oder einen Antigen-Antikörper-Komplex, werden die Proteasen C1r und C1s aktiv. C1r spaltet C1s und aktiviert diese so. C1s spaltet daraufhin C4 in C4a und C4b, wodurch eine reaktive Thioestergruppe in C4b freigelegt wird. Über diese Thioestergruppe bindet C4b kovalent an die Oberfläche des Antigens (Opsonisierung). Das oberflächengebundene C4b rekrutiert lösliches C2. Dieses wird durch C1s in C2a und C2b gespalten. C2b assoziiert mit C4b und bildet so die C3-Konvertase (C4b2b).

Der Lektin-Weg

Ähnlich dem klassischen Weg fungiert auch für den Lektin-Weg die Erkennung von Antigenen über PRM als Initiationspunkt. Die PRMs Mannose-bindendes Lektin (*mannose binding lectin*, *MBL*) oder Ficolin binden an ihre jeweiligen Antigene und aktivieren die assoziierten Serinproteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3 (*MBL associated serine protease*) [20]. Diese sind strukturell ähnlich zu C1r und C1s. MASP-2 spaltet sowohl C4 und C2 und erzeugt so die o.g. C3-Konvertase C4b2b. Demgegenüber hat MASP-1 nur Proteaseaktivität für C2, nicht aber für C4 [21].

Amplifikation

Die oberflächengebundenen C3-Konvertasen des klassischen bzw. Lektin-Wegs (C4b2b) und des alternativen Wegs (C3bBb) spalten lösliches C3 in C3a und C3b, welches kovalent an die Oberfläche bindet und diese somit opsonisiert. Darüber hinaus rekrutiert das so auf die Oberfläche gebrachte C3b löslichen Faktor B, welcher von Faktor D gespalten wird und eine neue C3-Konvertase des alternativen Wegs bildet (C3bBb). Auf diese Weise verstärkt und beschleunigt sich die Komplementdeposition selbst. Da hierbei immer mehr C3-Konvertase-Komplexe gebildet werden, welche ihrerseits C3 spalten, wird der Vorgang „*C3 amplification loop*“ genannt. Der Anteil des alternativen Wegs an der C3b-Deposition beträgt aufgrund dieses Verstärkungsmechanismus schließlich 80-90 % [22]. Neben dem beschriebenen Verstärkungsmechanismus und der C3b-Deposition (Opsonisierung) erfüllt die zusätzliche Ablagerung von C3b auf die Antigenoberfläche einen weiteren Zweck: C3b kann mit bestehenden C3-Konvertasen assoziieren (sowohl mit C4bC2b als auch mit C3bBb) und bildet so eine C5-Konvertase (C4b2b3b oder C3bBb3b). Diese rekrutiert lösliches C5 und spaltet es in C5a und C5b [13].

TCC

C5b rekrutiert das lösliche Komplementprotein C6. Dadurch entsteht im C5b6-Komplex eine neue Bindungsstelle für C7. Bindet C7 an den Komplex, wird dieser insgesamt hydrophob und integriert sich in die Plasmamembran der Zielzelle. Daraufhin assoziiert C8 mit dem Komplex, gefolgt von der Bindung von bis zu vierzehn C9-Proteinen [6]. Zusammen bilden alle diese Proteine den Membranangriffskomplex (TCC). Dieser bildet eine Pore in der Plasmamembran der Zielzelle und zerstört so die elektrochemischen Gradienten der Zelle und erlaubt weiterhin das Eindringen antimikrobieller Substanzen in die Zelle. Diese stirbt in der Folge ab [13, 23].

1.2.2. Komplementregulatoren

Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Opsonisierung jeder ungeschützten Oberfläche. Hierbei wird nicht zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterschieden. Dies ist einerseits nützlich, da so das Komplementsystem auch die Opsonisierung und folglich die Beseitigung apoptotischer und nekrotischer Zellen vermitteln kann, birgt aber andererseits die Gefahr autoimmunologischer Angriffe auf gesunde, körpereigene Zellen. Um diese Zellen vor Schädigung durch das Komplementsystem zu schützen, besitzt der menschliche Organismus eine Reihe von löslichen und membranständigen Komplementregulatoren, welche die Aktivität des Komplementsystems an der Oberfläche körpereigener Zellen inhibieren. Diese Regulatoren inhibieren die Komplementaktivierung sowie die Komplementkaskade auf verschiedenen Ebenen. [24, 25].

Faktor H

Der wichtigste Regulator des alternativen Wegs ist Faktor H. Faktor H ist ein Serumprotein (ca. 150-500 µg/ml) [26, 27] von ca. 150 kDa. Strukturell gliedert es sich in 20 SCRs (*short consensus repeats*), welche jeweils ca. 60 Aminosäuren umfassen [28]. Faktor H wirkt auf verschiedenen Ebenen der Komplementkaskade. Erstens fungiert es als Cofaktor für die Protease Faktor I, welche C3b in iC3b spaltet und damit inaktiviert. iC3b kann keinen Faktor B mehr rekrutieren und damit die Komplementreaktion nicht weiter verstärken. Zweitens beschleunigt Faktor H die Dissoziation der C3-Konvertase des alternativen Wegs C3bBb (*decay acceleration*) und unterbricht so ebenfalls den Verstärkungsmechanismus (*amplification loop*) des alternativen Wegs [29–31]. Die regulatorischen Funktionen von Faktor H werden durch die SCRs 1-4 vermittelt [32, 33].

Faktor H wird an die Oberfläche von körpereigenen Zellen gebunden. Die Bindung erfolgt über die SCRs 18-20, welche mit Sialinsäuren oder Glykosaminoglykanen (GAG) interagieren [34, 35]. Auf diese Weise wird die Komplementaktivität auf körpereigenen Zellen herunterreguliert und Komplement-vermittelte Zellschädigungen vermieden.

FHL-1

Bei FHL-1 (*Factor H-like protein 1*) handelt es sich um eine Spleißvariante von Faktor H, welche die SCRs 1-7 umfasst. Das Protein hat eine Molekülmasse von 42 kDa und eine Serumkonzentration von 50 µg/ml [36]. Es gleicht in seiner Funktion Faktor H, hat also einerseits Cofaktoraktivität für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b [32] und beschleunigt andererseits die Dissoziation sowohl der C3- als auch der C5-Konvertase des alternativen Wegs, ist dabei aber nur ca. 1 % so effektiv wie Faktor H [37]. Wie im Falle von Faktor H sind die SCRs 1-4 für die Aktivität von FHL-1 verantwortlich [32, 37]. FHL-1 bindet über die SCR 4 an die Zelloberfläche körpereigener Zellen [38].

CFHR1

CFHR1 (*Complement Factor H related protein 1*) ist ein Serumprotein, das in zwei unterschiedlich glykosylierten Varianten vorliegt (CFHR1β: 42 kDa; CFHR1α: 37 kDa) [39]. Die Serumkonzentration liegt bei 70-100 µg/ml [40, 41]. Das Protein besteht aus fünf SCRs, wobei die SCRs 3-5 große Homologien zu den SCRs 18-20 von Faktor H zeigen [39, 42]. Aus diesem Grunde konkurriert CFHR1 mit Faktor H um die Bindung an die Oberfläche körpereigener Zellen [41]. Das Protein liegt im Serum als Homodimer vor, wobei die Dimerisierung über die SCRs 1-2 erfolgt [43]. Funktionell unterscheidet sich das Protein deutlich von Faktor H. Es inhibiert einerseits die C5-Konvertase bei der Spaltung von C5 [41] und blockiert andererseits die Bindung von C7 an C5b6 und damit den Aufbau des TCC [41]. Neben CFHR1 sind mit CFHR2 – CFHR5 weitere Faktor-H-verwandte Proteine bekannt [42].

C4BP

C4BP (*C4b-binding protein*) ist ein löslicher Regulator des klassischen und Lektin-Wegs. Das Protein hat eine Molekülmasse von insgesamt 570 kDa und eine Serumkonzentration von ca. 300 µg/ml [44]. Es setzt sich aus sieben α-Untereinheiten (je 70 kDa, 8 SCRs) und einer β-Untereinheit (45 kDa, 3 SCRs) zusammen. Funktionell besitzt C4BP Cofaktoraktivität für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C4b, welches damit inaktiviert wird [45]. Weiterhin beschleunigt C4BP die Dissoziation der C3-Konvertase des klassischen und Lektin-Wegs (C4b2b) [46].

Plasminogen

Das Zymogen Plasminogen ist ein Serumprotein (ca. 200 µg/ml) von 92 kDa und wird hauptsächlich in Leberzellen gebildet [47]. Durch proteolytische Spaltung wird Plasminogen zur Serinprotease Plasmin umgesetzt. Plasmin spielt eine wichtige Rolle in der Hämostase, indem es das in Thromben enthaltene Fibrin spaltet und so zur Auflösung von Blutgerinnseln beiträgt (Thrombolyse) [48]. Die Umsetzung von Plasminogen in Plasmin wird durch Proteasen vermittelt. Diese können körpereigenen (Urokinase (uPA), *tissue plasminogen activator* (tPA), Faktor XII) aber auch körperfremden (Streptokinase, Staphylokinase) Ursprungs sein [49]. Neben Fibrin spaltet Plasmin auch Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin und Fibrinogen [50] sowie Immunglobuline [51] und die Komplementproteine C3, C3b, C5 und C5b [52, 53]. Auf diese Weise fungiert Plasminogen als Komplementregulator und inhibiert die Komplementkaskade [52].

CD35 (CR1)

Das Protein CD35 (*cluster of differentiation 35*) ist ein Transmembranprotein von ca. 220 kDa und gehört damit zu den oberflächengebundenen Komplementregulatoren. CD35 wird auch als C3b/C4b-Rezeptor oder Komplementrezeptor 1 (*complement receptor 1, CR1*) bezeichnet. CD35 findet sich unter anderem auf Erythrozyten und insbesondere auf neutrophilen Granulozyten und B-Zellen [54]. Durch proteolytische Spaltung von oberflächenständigem CR1 wird eine lösliche Form freigesetzt [55]. CD35 fungiert als Rezeptor für C3b und C4b und vermittelt so die Phagozytose von opsonisierten Antigenen [56, 57]. Daneben ist CD35 ein multipotenter Komplementregulator. CD35 beschleunigt die Dissoziation der C3- und C5-Konvertasen aller Komplementwege [58, 59]. Weiterhin besitzt CR1 Cofaktoraktivität für die Protease Faktor I und unterstützt so den Abbau von C3b und C4b [60, 61]. Auf diese Weise trägt CD35 zum Schutz körpereigener Zellen vor Komplement-vermittelter Zellschädigung bei [62]. Auf B-Zellen vermittelt die Bindung von C3 an CD35 die Inhibition der Proliferation [63] und der Differenzierung [64]. Die Aktivierung von CD35 inhibiert ebenfalls die Proliferation von T-Zellen [65].

Tabelle 1.1: Komplementregulatoren

Lösliche Regulatoren	
Faktor H	Cofaktor für Faktor I, Dissoziation der C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBb)
FHL-1	Cofaktor für Faktor I, Dissoziation der C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBb)
CFHR1	Inhibierung der C5-Konvertase und des TCC-Aufbaus
C4BP	Cofaktor für Faktor I, Dissoziation der C3-Konvertase des klassischen Wegs (C4bC2b)
Plasminogen	Inaktivierung von C3b
Vitronektin	Inhibierung des TCC-Aufbaus [66]
Properdin (Faktor P)	Initiierung des alternativen Wegs, stabilisiert C3-Konvertase [67]
C1 inhibitor (C1INH)	Dissoziation des C1-Komplexes, Dissoziation von MASP und MBL [68]
Carboxypeptidase N	Abbau von C3a und C5a zu C3a ^{desArg} und C5a ^{desArg} [69]
Clusterin	Inhibierung des TCC-Aufbaus [70]
Membranständige Regulatoren	
CD35 (CR1)	Cofaktor für Faktor I, Phagozytose von Immun-komplexen, Dissoziation der C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBb) und des klassischen Wegs (C4bC2b)
CD55 (DAF)	Beschleunigung des Abbaus der C3-Konvertasen [71]
CD46 (MCP)	Cofaktor für Faktor I [72]
CD59 (Protektin)	Inhibierung des TCC-Aufbaus [73]

1.2.3. Effektorfunktionen des Komplementsystems

TCC

Die Bildung des TCC ist Endpunkt der Komplementkaskade und führt zur Lyse der Zielzelle. Jedoch ist eine Reihe von Pathogenen vor diesem Mechanismus geschützt. So kann die Zellwand von grampositiven Bakterien und von *C. albicans* vom TCC nicht durchdrungen werden [74–76]. Andererseits vermitteln die Proteine des TCC neben der lytischen Funktion auch aktivierende Effekte auf weitere Immunzellen und tragen auf diese Weise zur Immunantwort bei [77].

Anaphylatoxine

Die bei der Spaltung von C3, C4 und C5 entstehenden kleinen Proteinfragmente C3a, C4a und C5a sind Anaphylatoxine. Diese kleinen Proteine (ca. 9 kDa) induzieren über ihre Rezeptoren (v.a. C3aR und C5aR) verschiedene Effekte der entzündlichen Immunantwort. So wirken Anaphylatoxine auf Leukozyten, insbesondere auf Phagozyten. Weiterhin wirken die Anaphylatoxine chemotaktisch und rekrutieren Leukozyten wie Neutrophile, Monozyten und Makrophagen zur Stelle der Komplementaktivierung. Das Phagozytosevermögen dieser Zellen wird verstärkt und ferner die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen induziert. Auf diese Weise verstärken Anaphylatoxine die angeborene Immunreaktion [9, 78]. Anaphylatoxine beeinflussen weiterhin die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und tragen so zum Aufbau der adaptiven Immunreaktion bei [10, 79]. Darüber hinaus wirken sowohl C3a als auch C5a direkt antimikrobiell [80].

Opsonisierung und Phagozytose

In Folge der Aktivierung der Komplementkaskade werden C3-Konvertasen auf der Antigenoberfläche gebildet. Diese setzen C3 in C3a und C3b um, wobei letzteres kovalent an die Antigenoberfläche bindet (Opsonisierung). Das an der Antigenoberfläche abgelagerte C3b und dessen Abbauprodukt iC3b – aber auch C4b und iC4b – werden von Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten erkannt. CR1 (CD35, s.o.) bindet an C3b und C4b und vermittelt deren Abbau zu iC3b und iC4b. Darüber hinaus binden sowohl CR1 als auch die Komplementrezeptoren 3 (CR3, CD11b:CD18) und 4 (CR4, CD11c:CD18) und CRIg (*Complement receptor of the immunoglobulin family*) an iC3b und induzieren so die Phagozytose des opsonisierten Antigens [3, 81, 82]. CR3 trägt darüber hinaus zur Produktion von Zytokinen und zur Migration von Leukozyten bei [9]. Die Abbauprodukte von C3b, C3dg und C3d, sind Liganden für den Komplementrezeptor 2 (*complement receptor 2, CR2*, auch CD21), welcher auf B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen (*follicular dendritic cells, FDCs*) exprimiert wird. FDCs binden über CR2 opsonisierte Antigene (Immunkomplexe), welche nicht internalisiert, sondern fortwährend präsentiert werden. In B-Zellen verstärkt die Bindung eines opsonisierten Antigens an CR2 die Aktivierung der Zellen (s.u.) [3].

1.2.4. Komplement und das adaptive Immunsystem

Das Komplementsystem ist ein zentraler Bestandteil des menschlichen Immunsystems. Neben den beschriebenen Funktionen der Opsonisierung von Antigenen und der Lyse von Pathogenzellen sind Komplementproteine auf mannigfaltige Weise mit anderen Bestandteilen des Immunsystems vernetzt. Die auf Antigenoberflächen abgelagerten Komplementproteine werden von Komplementrezeptoren erkannt und vermitteln die Phagozytose des Antigens [3, 81]. Die im Laufe der Komplementkaskade abgespaltenen löslichen Komplementproteine C3a, C4a und C5a sind potente Anaphylatoxine [78]. Neben diesen Effekten auf das angeborene Immunsystem beeinflussen Komplementproteine auch das adaptive Immunsystem.

Vernetzung des Komplementsystems mit T-Zellen

Die Anaphylatoxine C3a und mehr noch C5a wirken auf Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und verstärken die APC-vermittelte Aktivierung von T-Zellen. Derartig stimulierte T-Zellen differenzieren vermehrt zu Th1-Zellen [83]. Darüber hinaus binden C3a und C5a direkt an T-Zellen und liefern costimulatorische Signale zur Aktivierung der Zellen [84] und zur Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen [85]. Durch Bindung von mit C3b opsonisierten Antigenen an den Komplementrezeptor CD46 (*membrane cofactor protein, MCP*) wird die Differenzierung von Th1-Zellen verstärkt [86] und deren Zytokinproduktion kontrolliert [87, 88].

Vernetzung des Komplementsystems mit B-Zellen

Das humane Komplementsystem ist nicht einzig Teil des angeborenen Immunsystems, sondern interagiert auch auf mannigfaltige Weise mit Zellen des adaptiven Immunsystems. C3dg und C3d sind kleine Proteine, welche nach der Faktor I-vermittelten Spaltung von C3b kovalent an die Antigenoberfläche gebunden bleiben [11, 89]. Die Abbauprodukte von oberflächengebundenem C3b, insbesondere C3dg und C3d, sind Liganden für den Komplementrezeptor 2 (CR2) [90]. An Antigenoberflächen gebundene C3dg- und C3d-Moleküle fungieren als molekulares Adjuvans, indem sie an den B-Zell-Corezeptor binden und so BCR und Corezeptorkomplex vernetzen (s.o.). Die Vernetzung des B-Zell-Rezeptors mit dem B-Zell-Corezeptor resultiert in einer Senkung der Aktivierungsschwelle der B-Zellen um mehrere Größenordnungen [91, 92]. Auf diese Weise fungiert das Komplementsystem als Verstärker der adaptiven Immunreaktion und es können bei erstmaligem Antigenkontakt auch B-Zellen mit niedriger Affinität aktiviert werden [93]. Eine weitere Funktion des Komplementrezeptors 2 (CR2) ist die Aufnahme von opsonisierten Antigenen und die anschließende Präsentation von Antigenfragmenten über den MHC II durch B-Zellen [94, 95]. Während der Ausbildung der Keimzentren in den sekundären lymphatischen Organen verstärken Signale des Komplementrezeptors 2 (CR2, CD21) die Proliferation und Differenzierung der aktivierten B-Zellen [96, 97]. Von großer Bedeutung sind CR1 und CR2 für folliculäre dendritische Zellen (FDCs, s.o.). Diese Zellen binden opsonisierte Antigene über die Komplementrezeptoren, internalisieren sie aber nicht,

sondern präsentieren sie fortwährend. Die so präsentierten Antigene tragen zu Differenzierung, Affinitätsreifung und Klassenwechsel der B-Zellen in den Keimzentren der Lymphfollikel bei [98].

Die Anaphylatoxine C3a und C5a stimulieren die B-Zell-Antwort, indem die frühe Produktion von niedrigaffinen Antikörpern zugunsten der Affinitätsreifung gedrosselt wird (C3a [79]) und die Migration von B-Zellen vermittelt wird (C5a [99]). C5a induziert die Expression des IgG-Rezeptors FcγRIII in B-Zellen, während die Expression des inhibitorischen FcγRII reduziert wird [100].

1.3. B-Zellen

Innerhalb des adaptiven Immunsystems nehmen die B-Lymphozyten eine zentrale Rolle ein. Diese Zellen reagieren auf eindringende Antigene, indem sie Antikörper produzieren. Dabei ist jeder Antikörperklon hochspezifisch für ein bestimmtes Antigen. Dies können sowohl körperfremde wie auch körpereigene Strukturen sein. Antikörper stellen die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems dar.

Die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen trägt auf mehrere Weisen zur Bekämpfung und Beseitigung desselben bei. So werden erstens eindringende Pathogene zur Phagozytose markiert (Opsonisierung) sowie zweitens deren weitere Opsonisierung durch das Komplementsystem induziert. In beiden Fällen wird so die Phagozytose des Antigens erleichtert. Drittens werden die Erreger am Wachstum gehindert und viertens Toxine der Pathogene durch Antikörper neutralisiert [3].

1.3.1. B-Zell-Entwicklung

Alle Lymphozyten nehmen ihren Anfang in primären lymphatischen Organen. B-Lymphozyten stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese differenzieren zunächst in multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitor cells, MPP*) und weiter in gemeinsame Lymphozytenvorläuferzellen (*common lymphoid progenitor cells, CLP*), welche den gemeinsamen Vorläufertyp für B- und NK-Zellen bilden [3]. Die Zellen erhalten weitere Stimuli von Stromazellen des Knochenmarks und differenzieren so zu Pro-B-Zellen. In diesem Stadium beginnt die Entwicklung des spezifischen B-Zell-Rezeptors durch VDJ-Rekombination der codierenden Gensegmente. Innerhalb des B-Zell-Rezeptors binden die *Complementarity-determining regions* (CDRs) an das Antigen. Die Sequenzen der für die CDRs codierenden Gene determinieren die Struktur und damit die Antigenspezifität des B-Zell-Rezeptors. Während der VDJ-Rekombination wird zunächst nur die schwere Kette des B-Zell-Rezeptors gebildet. Ist die Rekombination abgeschlossen, wird diese innerhalb eines Prä-B-Zell-Rezeptors

exprimiert. Erweist sich dieser als funktional, liefert dies die Signale zur weiteren Differenzierung der B-Zelle, die nun zur Prä-B-Zelle heranreift. Andernfalls endet die B-Zell-Differenzierung und die nicht-funktionalen Pro-B-Zellen leiten die Apoptose ein [3]. Die entstandenen Prä-B-Zellen mit funktioneller schwerer Kette proliferieren und es wird die Rekombination der Gensegmente der leichten Ketten des B-Zell-Rezeptors eingeleitet. Somit steht eine Reihe von Zellen mit identischer funktionaler schwerer Kette zur Generierung der leichten Kette zur Verfügung. Bei erfolgreicher VJ-Rekombination der Gensegmente der leichten Kette wird schließlich ein funktionelles Protein gebildet, welches sich mit der schweren Kette zum B-Zell-Rezeptor (IgM) zusammenlagert und an der Zelloberfläche exprimiert wird. Damit tritt die Zelle in das Stadium der unreifen B-Zelle ein [3]. Der vollständige B-Zell-Rezeptor besteht neben dem membranverankerten IgM aus einem Heterodimer der membranspannenden Proteine Igα und Igβ. Diese vermitteln bei Antigenbindung die Signaltransduktion ins Zellinnere. Die unreifen B-Zellen kommen nun in Kontakt mit einer Vielzahl körpereigener Antigene. Reagiert eine Zelle auf solch ein Autoantigen, wird in der Mehrzahl der Fälle der Zellreifungsprozess abgebrochen und die Zelle wird apoptotisch (*clonal deletion*). Es ist allerdings auch möglich, dass die leichte Kette des B-Zell-Rezeptors modifiziert wird (*receptor editing*), dass die Zelle in einen Zustand permanenter Anergie (Inaktivierbarkeit) übergeht oder dass äußerst schwach autoreaktive Zellen diesen Selektionsprozess überleben. Im Anschluss an diesen *central tolerance* genannten Selektionsprozess verlassen die B-Zellen schließlich das Knochenmark und gelangen über den Blutkreislauf zur Milz, einem sekundären lymphatischen Organ. Die Migration der B-Zellen in die Milz wird über Chemokine vermittelt (CXCL13, *B-lymphocyte chemokine*, *BLC*). Nur etwa die Hälfte der migrierenden B-Zellen erreicht tatsächlich die Lymphfollikel in der Milz. Die in der Peripherie verbleibenden B-Zellen sterben nach etwa drei Tagen ab [3].

Innerhalb der Milz sammeln sich B-Zellen in der weißen Pulpa. Diese wird von Arteriolen durchzogen, welche von einer Schicht lymphatischen Gewebes umhüllt sind (*periarteriolar lymphoid sheath*, *PALS*). Dieses besteht überwiegend aus T-Zellen. An das PALS sind Lymphfollikel angelagert, welche die B-Zellen enthalten. In den Lymphfollikeln wiederum befinden sich Keimzentren. Dort findet im Lauf der adaptiven Immunreaktion intensive B-Zell-Differenzierung und Proliferation statt. Hierzu tragen follikuläre dendritische Zellen signifikant bei (s.o.). Sind die B-Zellen in die Lymphfollikel aufgenommen worden, erhalten sie dort Stimuli (insbesondere *B-cell activating factor belonging to the TNF family*, *BAFF*), welche das Überleben der Zellen gewährleisten. So können die B-Zellen erneut in die Peripherie migrieren und dort für einige Wochen zirkulieren. Diese Zellen differenzieren in der Folge zu reifen (auch: naiven) B-Zellen heran. Die in der Peripherie zirkulierenden naiven B-Zellen durchlaufen erneut eine Selektion autoreaktiver Zellen. Der Mechanismus gleicht der beschriebenen *central tolerance* und wird daher analog als *peripheral tolerance* bezeichnet [3].

Treffen naive B-Zellen in der Peripherie auf ihr spezifisches Antigen und erhalten costimulierende Signale von T-Zellen sowie Zytokinen, werden die Zellen aktiviert und die B-Zell-vermittelte Immunreaktion wird eingeleitet [3, 4].

1.3.2. B-Zell-Aktivierung

Die Aktivierung einer B-Zelle zur Initiierung der B-Zell-Antwort erfordert drei distinkte Stimuli (Abbildung 1.2). Bindet eine B-Zelle über den B-Zell-Rezeptor ihr spezifisches Antigen, liefert dies spezifische Aktivierungssignale an die Zelle (Signal 1). Darüber hinaus gehören B-Zellen zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Der Antigen:B-Zell-Rezeptor-Komplex wird internalisiert und intrazellulär prozessiert. Die dabei entstehenden Antigenpeptide assoziieren mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex II, MHC II*), welcher an die Zelloberfläche transportiert und dort T-Zellen präsentiert wird. Aktivierte Antigen-präsentierende B-Zellen werden in sekundären lymphatischen Organen zurückgehalten, wo sie mit T-Zellen zusammentreffen. Der MHC II:Antigenpeptid-Komplex der B-Zelle wird vom T-Zell-Rezeptor einer T-Helferzelle gleicher Antigenspezifität erkannt (*linked recognition*) und diese Bindung durch CD4 stabilisiert. Das Oberflächenmolekül CD40L (CD154) der T-Helferzelle bindet in der Folge an seinen Rezeptor CD40 auf der B-Zelle. Dadurch erhält die B-Zelle einen notwendigen Costimulus zur Aktivierung (Signal 2) [101, 102]. Weiterhin produziert die T-Helferzelle Zytokine (IL-4 u.a.), die auf die unmittelbar benachbarte B-Zelle wirken und so zu deren Aktivierung beitragen (Signal 3) [103, 104]. Findet keine Interaktion mit T-Zellen statt, sterben die Antigen-stimulierten B-Zellen nach ca. 24 Stunden ab.

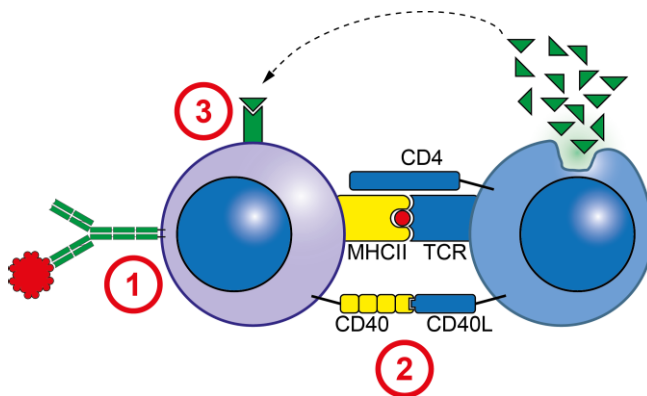


Abbildung 1.2: B-Zell-Aktivierung

Die Aktivierung einer B-Zelle erfordert drei Stimuli. (1) Die Erkennung eines spezifischen Antigens über den B-Zell-Rezeptor. (2) Zell:Zell-Kontakt zu T-Helferzellen. Über den MHC II präsentieren B-Zellen prozessierte Antigene, die von einer T-Zelle mit spezifischem T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor, TCR*) erkannt werden. Über CD4 wird diese MHC II:TCR-Interaktion stabilisiert. CD40L (CD154) der T-Zelle interagiert mit CD40 der B-Zelle und liefert so ein costimulatorisches Signal zur B-Zell-Aktivierung. (3) Von der T-Zelle produzierte Zytokine wie IL-4 und IL-10.

B-Zell-Differenzierung

Nach der Aktivierung der B-Zelle beginnt diese zu proliferieren. Teile der entstehenden Tochterzellpopulationen differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Zellen (*antibody secreting cells*, ASCs). Diese werden Plasmazellen genannt. Zunächst jedoch entstehen als Zwischenstufe Plasmablasten. Plasmablasten sezernieren Antikörper und besitzen deshalb bereits einen ausgeprägten Golgi-Apparat, verfügen aber gleichzeitig noch über membranverankertes Immunglobulin sowie MHC II-Moleküle. Im Laufe der Ausdifferenzierung zur Plasmazelle verliert der Plasmablast das meiste oberflächenverankerte Immunglobulin sowie den MHC II und damit die Fähigkeit, als Antigen-präsentierende Zelle zu fungieren und mit T-Zellen zu interagieren. Darüber hinaus proliferieren Plasmazellen nicht weiter. Plasmazellen verlassen schließlich die sekundären lymphatischen Organe und zirkulieren in der Peripherie. Die von ihnen sezernierten Antikörper bilden die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort. Die Lebensspanne dieser Plasmazellen beträgt meist zwischen einigen Tagen und mehreren Wochen. Andere Plasmazellen wandern ins Knochenmark ein und verbleiben dort für lange Zeit (*long-lived plasma cells*). Diese Zellen produzieren kontinuierlich Antikörper und bilden so einen Teil des immunologischen Langzeitschutzes [3, 105].

Affinitätsreifung

Im Laufe der Proliferation aktivierter B-Zellen findet die somatische Hypermutation (*Affinitätsreifung*) statt. Hierbei werden zufällig Punktmutationen in die für die V-Regionen des Immunglobulins codierenden Genen eingefügt. Diese verursachen kleine Veränderungen der Aminosäuresequenz der *Complementarity-determining regions* (CDRs) und beeinflussen so die Affinität des Immunglobulins zum Antigen. Zellen, deren Affinität auf diese Weise gesteigert wurde, haben einen Selektionsvorteil gegenüber schwächer Antigen-bindenden Zellen und verdrängen diese in der Folge. Auf diese Weise nimmt die Antigenaffinität der aktivierten B-Zellen und der produzierten Antikörper deutlich zu [3].

Klassenwechsel

Während der Differenzierung der aktivierten B-Zelle unterliegt die konstante Region des Immunglobulins Veränderungen. Die von T-Helferzellen gelieferten costimulatorischen Signale (CD40 sowie Zytokine wie IL-4 u.a.) induzieren Neuankordnungen im Genom. In der Folge werden codierende Gensegmente des Immunglobulins ausgetauscht und so die Klasse der gebildeten Antikörper verändert. In naiven B-Zellen werden membranverankerte Immunglobuline der Klassen IgM und IgD gebildet. In Folge der genetischen Neuankordnungen werden lösliche Immunglobuline der Klassen IgG und im weiteren Verlauf IgA und IgD gebildet. Hierbei ist IgG die bei weitem häufigste Klasse und macht über 75 % der im Plasma vorhandenen Immunglobuline aus [3].

Immunologisches Gedächtnis

Im Gegensatz zur Differenzierung zu Plasmazellen differenzieren andere aktivierte B-Zellen zu B-Gedächtniszellen. Bei diesen handelt es sich um sehr langlebige Zellen ohne nennenswerte Proliferation und membranständigem Immunglobulin. Sie haben zumeist sowohl die Affinitätsreifung als auch den Klassenwechsel durchlaufen, teilweise jedoch nicht [106]. Gedächtniszellen zirkulieren durch sekundäre lymphatische Organe und werden bei Antigenkontakt erneut aktiv. Die Immunreaktionen gleichen den zuvor beschriebenen Abläufen. Jedoch verfügen die Zellen infolge der früheren Affinitätsreifung über eine höhere Affinität zu ihrem spezifischen Antigen und produzieren daher schneller hochaffine Antikörper. Darüber hinaus liegt eine höhere Anzahl von Antigen-spezifischen Gedächtniszellen vor als naive Antigen-spezifische B-Zellen im Falle der primären Immunantwort. Insgesamt ist so die Immunreaktion bei erneuter Antigenexposition stärker. Das immunologische Gedächtnis bildet die Grundlagen für die aktive Immunisierung und den Schutz vor Infektionskrankheiten durch Impfungen [3].

1.3.3. Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors

Der B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor, BCR*) setzt sich zusammen aus zwei Proteinkomplexen mit klar getrennter Funktion. Die Antigenspezifität des Rezeptors wird von einem membranverankerten Immunglobulin der Klasse IgM vermittelt (Ligandenbindungsfunktion). Das Immunglobulin hat keine intrazellulären Domänen und nimmt nicht an der Signalweiterleitung ins Zellinnere teil. Daneben gehört zum B-Zell-Rezeptor ein Heterodimer aus kovalent verbundenerm Ig α und Ig β (CD79a + CD79b), welches mit dem Immunglobulin assoziiert. Dieses Heterodimer überträgt die Signale bei Bindung eines Antigens ins Zellinnere (Signaltransduktionsfunktion). Die intrazellulären Domänen von Ig α und Ig β enthalten jeweils eine ITAM-Sequenz (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Die Tyrosin-Proteinkinasen der Src-Familie – Fyn, Blk und Lyn – assoziieren mit den Tyrosin-Seitenketten der ITAMs. Zur Initiierung der Signaltransduktion des BCRs ist es erforderlich, dass mehrere BCR-Komplexe vernetzt werden (*cross-linking*). Hierzu binden die Immunglobuline von zwei oder mehr BCRs an dasselbe Antigen und bringen so ihre jeweiligen intrazellulären Domänen zusammen. Dadurch werden die o.g. Kinasen aktiviert und phosphorylieren die ITAMs der beteiligten B-Zell-Rezeptoren. Hierbei ist Lyn von herausragender Bedeutung. Die Phosphorylierungsstellen der ITAMs dienen der Rekrutierung der Tyrosin-Proteinkinase Syk, welche dadurch aktiviert wird. Syk phosphoryliert das Adapterprotein BLNK (*B cell linker protein*), welches an Ig α assoziiert ist. Phosphoryliertes BLNK rekrutiert nun Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), PLC γ 2 (*Phospholipase Cy2*) sowie Vav und damit den B-Zell-Corezeptorkomplex. Btk phosphoryliert und aktiviert PLC γ 2. PLC γ 2 hydrolysiert PIP $_2$ (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat*) zu DAG (*Diacylglycerol*) und IP $_3$ (*Inositoltriphosphat*).

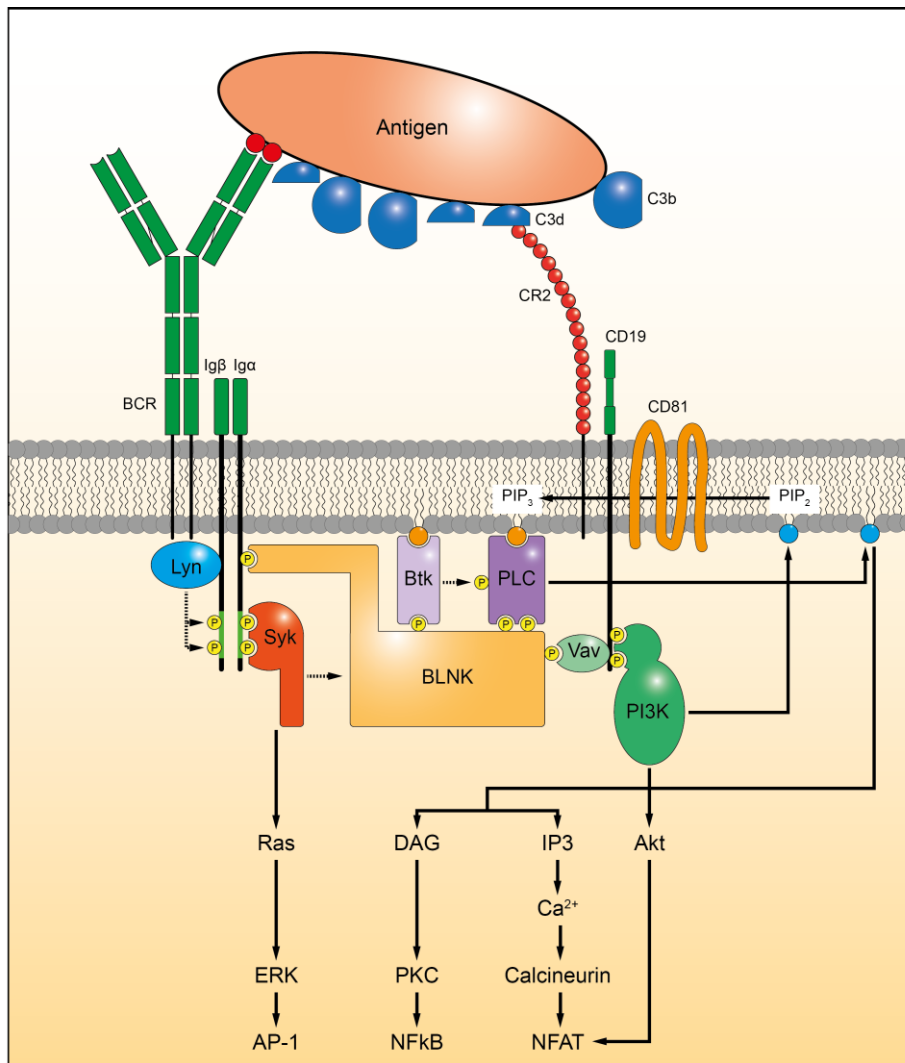


Abbildung 1.3: Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors und –Corezeptorkomplexes

Die Bindung eines Antigens löst die Phosphorylierung der ITAM-Sequenz des Igα:Igβ –Dimers aus. Syk assoziiert an das phosphorylierte ITAM und phosphoryliert BLNK. Btk, PLCγ2 und Vav binden an die Phosphorylierungsstellen von BLNK. Btk phosphoryliert und aktiviert PLCγ2, welche wiederum PIP2 zu DAG und IP3 spaltet. Der durch Vav rekrutierte Corezeptorkomplex wird durch Lyn phosphoryliert und so PI3K rekrutiert. PI3K phosphoryliert PIP2 zu PIP3. PIP3 rekrutiert Btk und PLCγ2, welche synergistisch zum Signalweg des B-Zell-Rezeptors wirken. So verstärkt der Corezeptor die B-Zell-Aktivierung. DAG aktiviert die PKC und in der Folge den Transkriptionsfaktor NFκB. IP3 aktiviert über Calcium und Calcineurin den Transkriptionsfaktor NFAT. Dieser Weg konvergiert mit der PI3K-abhängigen Aktivierung von Akt. G-Proteine wie Ras werden an den B-Zell-Rezeptor rekrutiert und aktiviert. Dies führt über den MAP-Kinase-Weg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

In der Folge werden drei unterschiedliche Signalwege ausgelöst. 1) IP₃ setzt Ca²⁺ aus extra- und intrazellulären Quellen frei. Calcium aktiviert die Phosphatase Calcineurin, welche wiederum den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktiviert. Dieser Weg konvergiert mit der PI3K-abhängigen Aktivierung von Akt (*Protein Kinase B, PKB*; s.u.). 2)

DAG und Ca^{2+} aktivieren die Proteinkinase C (PKC) und diese wiederum den Transkriptionsfaktor NF κ B. 3) Unabhängig von DAG und IP_3 assoziieren GEFs (*guanine-nucleotide exchange factors*) an den BCR und aktivieren kleine G-Proteine wie Ras. Der daraufhin ablaufende MAP-Kinase-Weg über ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Activator protein 1). Die genannten Transkriptionsfaktoren induzieren die Transkription verschiedenster Gene und somit die Zellproliferation und -differenzierung sowie die Produktion von Zytokinen (Abbildung 1.3) [3, 107].

1.3.4. Signaltransduktion des B-Zell-Corezeptorkomplexes

Der B-Zell-Corezeptor ist ein Proteinkomplex aus den Proteinen CD19, CD21 und CD81 und dient der Verstärkung der Signale des B-Zell-Rezeptors. CD21 (*CR2, complement receptor 2*) ist ein Rezeptor für das Komplementprotein C3d. Wird ein Komplement-opsonisiertes Antigen über den B-Zell-Rezeptor gebunden, bindet gleichzeitig CD21 das auf der Antigenoberfläche abgelagerte C3d. Auf diese Weise werden auf der B-Zell-Oberfläche der B-Zell-Rezeptor und der Corezeptor vernetzt (*cross-linking*, s.o.) und damit auch ihre intrazellulären Domänen zusammengebracht. Dadurch kann die intrazelluläre Domäne von CD19 durch die BCR-assoziierten Kinasen Fyn, Blk und Lyn phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von CD19 dient der Rekrutierung der Proteinkinase PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase*), welche PIP_2 zu PIP_3 phosphoryliert. Das membranständige PIP_3 rekrutiert die Proteinkinasen Btk und Akt welche synergistisch zur Signalkaskade des B-Zell-Rezeptors wirken (Abbildung 1.3). Auf diese Weise verstärkt der Corezeptorkomplex die Aktivierung der B-Zellen um den Faktor 10^2 [91]. Daher wird C3d auch als *molekulares Adjuvans* bezeichnet [108].

1.3.5. Zytokinproduktion durch B-Zellen

Die Hauptrolle von B-Zellen in der Immunantwort ist ihre Fähigkeit, in Plasmazellen zu differenzieren und große Mengen Antikörper zu produzieren, welche die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems ausmachen. Lange Zeit war dies die einzige bekannte Funktion von B-Zellen in der Immunreaktion. Jedoch sind B-Zellen auch hocheffektive antigenpräsentierende Zellen [109] und aktivieren T-Zellen [110]. Darüber hinaus produzieren B-Zellen Zytokine und beeinflussen so das Gleichgewicht des Immunsystems [111]. Lange Zeit wurde angenommen, dass B-Zellen zwar auf Zytokine reagieren, selber aber keinen Anteil am Zytokinmilieu der Immunantwort haben. Es wurde postuliert, dass B-Zellen in Folge ihrer Aktivierung die Chemokine CCL17 und CCL22 produzieren und so chemotaktisch T-Zellen rekrutieren. Diese wiederum versorgen die B-Zellen mit für die Proliferation und Differenzierung not-

wendigen Zytokinen wie IL-4 [112, 113]. Mittlerweile ist bekannt, dass B-Zellen nicht nur Chemokine, sondern auch zahlreiche Zytokine produzieren, die auf eine Vielzahl anderer Immunzellen wirken [111] und so den Ablauf der Immunreaktion beeinflussen [114, 115]. Die Produktion von Zytokinen in B-Zellen folgt dabei charakteristischen Mustern und ist auf die Gesamt-Immunantwort abgestimmt. Naive B-Zellen differenzieren zu B-Effektorzellen in Abhängigkeit der Costimulation durch T-Helferzellen. T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) induzieren B-Effektorzellen vom Typ 1 (Be-1). Diese produzieren IL-12 und IFN- γ und unterstützen damit wiederum die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen, welche die zellvermittelte Immunantwort v.a. über Makrophagen stimulieren [116]. Auf der anderen Seite induzieren T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen) Be-2-Zellen. Diese produzieren v.a. IL-2, IL-4 und IL-6 und unterstützen so die Differenzierung von Th2-Zellen [115]. Th2-Zellen verstärken die Proliferation von B-Zellen sowie die Produktion von Antikörpern [116]. Somit verstärken B- und T-Zellen die jeweilige Immunreaktion gegenseitig über die von ihnen produzierten Zytokine [115, 117, 118]. Neben den B-Effektorzellen, welche die Immunantwort verstärken, wurden auch B-Zellen identifiziert, die die Immunreaktion inhibieren. Diese Zellen werden *regulatorische B-Zellen* genannt (*regulatory B cells*, B_{regs}). Sie zeichnen sich durch die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10, TGF- β aber auch IL-35 aus [119–122]. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Zytokinen durch B-Zellen nicht nur im Zusammenspiel mit T-Zellen erfolgt, sondern auch PRRs wie Toll-like-Rezeptoren (*Toll-like receptors*, *TLRs*) eine Rolle spielen [123, 124]. Die Art des Antigens und damit der reagierende TLR bestimmt die Art der produzierten Zytokine [125]. Insbesondere einzelsträngige, CpG-reiche Oligonukleotide, welche als Liganden für TLR9 fungieren, induzieren eine Zytokinantwort in B-Zellen [126, 127]. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Rezeptor CD40 maßgeblich die Art der produzierten Zytokine beeinflusst. Die alleinige Stimulation von CD40 erzeugte ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil, dominiert von IL-10 bei nur geringer Produktion von TNF- α und IL-6. Wurde zusätzlich der B-Zell-Rezeptor aktiviert, resultierte ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil mit verminderter Produktion von IL-10, während TNF- α und IL-6 verstärkt gebildet wurden [122].

1.3.6. Regulatorische B-Zellen

Analog zu *regulatorischen T-Zellen* (T_{reg}) wurde innerhalb der B-Zellen eine Population identifiziert, der immun-inhibierende Effekte zugeschrieben werden und deshalb als *regulatorische B-Zellen* (B_{regs}) bezeichnet werden [119]. Regulatorische B-Zellen nehmen eine wichtige Rolle bei der Orchestrierung der Immunantwort ein [128, 129]. Bisher existiert kein universeller Marker für regulatorische B-Zellen. Während für regulatorische T-Zellen der Transkriptionsfaktor FoxP3 charakteristisch ist, gibt es bislang keinen definierten Transkriptionsfaktor für B_{regs} [130]. Daher wurden B_{regs} bislang nur anhand ihres Phänotyps oder aber ihrer Effektorfunktionen definiert. Als Hauptkriterium für regulatorische B-Zellen wird dabei die Produktion des anti-

inflammatorischen Zytokins IL-10 angesehen [129]. Im Menschen wurden unter anderem transitionale B-Zellen des Phänotyps CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD1d^{hi} [131, 132] und Gedächtniszellen des Phänotyps CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ [120] als B_{regs} beschrieben. Ob diese Zellen eine gemeinsame Abstammung haben oder aber zu verschiedenen Zeitpunkten während der B-Zell-Differenzierung entstanden, ist bisher noch unklar.

Viele Evidenzen deuten inzwischen darauf hin, dass Plasmablasten bzw. Plasmazellen (CD138⁺) die Hauptquelle von regulatorischen Zytokinen (IL-10 und IL-35) sind [133]. Die Transkriptionsfaktoren IRF4 und BLIMP-1 sind für die Entwicklung der regulatorischen Plasmazellen essentiell [121, 134, 135]. Es wurde postuliert, dass sich B-Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien zu regulatorischen B-Zellen entwickeln können und die entstandenen B_{regs} wiederum weiter zu regulatorischen Plasmazellen differenzieren [129].

Regulatorische B-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie anti-inflammatorische Zytokine produzieren. Hierzu zählen vor allem IL-10 [120, 132, 135, 136], TGF-β [137] und IL-35 [121]. Die durch B_{regs} produzierten Zytokine verschieben das immunologische Gleichgewicht und beeinflussen die Immunantwort [138]. So induziert einerseits von B_{regs} gebildeter TGF-β die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen, welche ihrerseits immunsuppressiv wirken [139–142], andererseits inhibieren die von B_{regs} gebildeten Zytokine die Proliferation und Differenzierung von Effektor-T-Zellen [131, 132, 143]. Weiterhin inhibieren B_{regs} die Funktion von dendritischen Zellen [144], NKT-Zellen [145] und den Klassenwechsel von differenzierenden B-Zellen [146].

1.3.7. Evasion der B-Zell-Immunantwort

B-Zellen nehmen in der Immunreaktion eine zentrale Rolle ein. Dies macht sie zu einem prominenten Ziel für Pathogene, welche die B-Zell-abhängige Immunreaktion manipulieren und so ihre Überlebenschancen im menschlichen Organismus erhöhen. Dabei bedienen sich die Pathogene unterschiedlichster Strategien und Mechanismen.

Pathogenreservoir

Intrazelluläre Bakterien und Viren infizieren Zellen und können im Zellinnern überdauern. Hier sind sie vor humoralen Immunreaktionen geschützt. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert zielgerichtet B-Zellen und nutzt diese als Vehikel zur Ausbreitung im Organismus. Weiterhin induziert das EBV die Bildung von B-Gedächtniszellen, in denen das Virus lange Zeit latent überdauern kann [147]. Das Maus-Mammatumovirus (MMTV) induziert die Proliferation von infizierten B-Zellen und schafft so ein Reservoir für die virale Vermehrung und Persistenz [148]. Auch bakterielle Pathogene nutzen B-Zellen als Reservoir. Hierzu zählen *Brucella spp.*, *Moraxella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Shigella spp.* und *Listeria spp.*. Eine Reihe von Pa-

thogenen induziert ihre Aufnahme in Zellen, indem die Phagozytose verstärkt wird [149], andere betreiben eine aktive Invasion der B-Zellen [150]. Weiterhin modulieren intrazelluläre Pathogene Signalwege der Wirtszelle und begünstigen so deren Überleben. Dies wurde für virale [151] und bakterielle Pathogene beschrieben [152].

Aktivierung und Antikörperproduktion

Einige intrazelluläre Pathogene modulieren die Signaltransduktion der infizierten B-Zelle und beeinflussen so die B-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Differenzierung. Dies führt beispielsweise dazu, dass die B-Zellen unspezifisch aktiviert und daraufhin Antikörper mit geringer Antigenspezifität gebildet werden (*Trypanosoma cruzi* [153], *Plasmodium falciparum* [154], HCV [155], HIV [156], *Borrelia burgdorferi* [157]). Andererseits blockieren einige Pathogene die Signaltransduktion in B-Zellen und inhibieren so die Proliferation, die Differenzierung und die Antikörperproduktion (*Bacillus anthracis* [158], *Yersinia pseudotuberculosis* [159]).

Die Proteine EfbC und Sbi von *Staphylococcus aureus* binden an C3dg und C3d und blockieren so deren Bindung an CR2 [160, 161] und damit die Co-Aktivierung von B-Zellen. Somit ist die Blockade der Interaktion von C3d und CR2 ein Evasionsmechanismus der adaptiven Immunreaktion [108, 162].

Regulatorische B-Zellen

Durch Modulation der Aktivierung von B-Zellen induzieren einige Pathogene die Differenzierung von B-Zellen zu regulatorischen B-Zellen. Dies wurde sowohl für parasitäre (*Leishmania major* [163], Helminthen [164]), bakterielle (*Salmonella typhimurium* [134]) als auch virale Infektionen (HIV [165], HBV [142]) beschrieben. In Maus-Infektionsmodellen konnte dabei gezeigt werden, dass in Folge der Infektion verstärkt regulatorische B-Zellen gebildet werden. Diese Zellen beeinflussten die Immunreaktion auf die Infektion, indem etwa die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen induziert [142, 164] oder die Differenzierung von T-Effektor-Lymphozyten inhibiert wurde [134]. Die Pathogene inhibieren auf diese Weise die Immunreaktion und begünstigen damit die Ausbreitung der Infektion. Die Induktion von regulatorischen B-Zellen wurde bisher nicht für fungale Pathogene beschrieben. Alle bisherigen Studien beschreiben die Entstehung regulatorischer B-Zellen in Folge einer Infektion. Es wurde bisher kein Virulenzfaktor der Pathogene ausgemacht, der die Differenzierung von B_{regs} induziert.

Induktion des Zelltods

Sowohl virale (Influenza-Virus [166]) als auch bakterielle (*Listeria monocytogenes* [167], *Shigella spp.* [168]) und parasitäre (*Trypanosoma cruzi* [169]) Pathogene induzieren die Apoptose der Zielzelle. So wird die Immunreaktion des Wirtsorganismus gestört.

1.4. *Candida albicans*

Der Hefepilz *Candida albicans* ist ein polymorpher Organismus. Einerseits wächst der Pilz in Form von einzelligen Hefezellen (Durchmesser ca. 4-10 µm) und bildet andererseits sowohl Pseudohyphen als auch echte Hyphen aus. Bei Pseudohyphen handelt es sich um Sprossverbände, also eine Aneinanderreihung von Hefezellen, während Hyphen langfädige Einzelzellen darstellen (mehrere mm Länge).

Candida albicans ist ein kommensaler Organismus der menschlichen Flora und daher in der dermalen, oralen, intestinalen und vaginalen Flora zu finden. Innerhalb der natürlichen Flora lebt *C. albicans* im Gleichgewicht mit anderen bakteriellen und fungalen Mikroorganismen. Gleichzeitig ist der Pilz ein opportunistisches Pathogen und löst unter bestimmten Bedingungen Infektionen aus [170]. Diese Bedingungen sind 1) Eine gestörte Balance der mikrobiellen Flora, welche die Ausbreitung von *C. albicans* begünstigt [171], 2) Defekte in der Epithelbarriere, die ein Eindringen von *C. albicans* ermöglichen und 3) Ein geschwächtes Immunsystem. Letzteres findet sich gehäuft bei Kleinkindern oder älteren Menschen sowie bei HIV- oder medikamentös immunsupprimierten Patienten. In der Folge kommt es zur Infektion mit *C. albicans*, der Candidiasis, welche mit Antimykotika behandelt werden kann. Jedoch nimmt die Anzahl resistenter Stämme von *C. albicans* stetig zu [93, 172, 173]. Die Candidiasis kann sich zu einer lebensbedrohlichen systemischen Infektion entwickeln, welche eine hohe Sterblichkeit aufweist [174]. Insbesondere in Krankenhäusern besteht ein hohes Infektionsrisiko. *C. albicans* ist der vierthäufigste Erreger nosokomialer Infektionen und hierbei der häufigste Pilz [175]. Im Falle von nosokomialen Infektionen liegt die Sterblichkeit mit über 20 % sehr hoch [175].

1.4.1. Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Zellwand

Charakteristisch für *C. albicans* ist dessen Zellwand. Diese setzt sich aus zwei Schichten zusammen. Die innere Zellwand besteht aus einer Schicht Chitin und einer darüber liegenden Schicht aus β -1,3-Glucan. Die äußere Zellwand besteht überwiegend aus stark vernetzten Mannosepolymeren (Mannanen). In dieses Netzwerk sind Proteine eingebettet (*cell wall proteins, CWP*). Die CWPs sind wiederum über β -1,6-Glucane an der inneren Zellwand verankert (Abbildung 1.4) [176]. Die Polysaccharide und CWPs der Zellwand stellen die hauptsächlichen Antigen determinanten (MAMPs) von *C. albicans* dar und lösen eine Immunreaktion aus [177]. Die Expression und Präsentation der MAMPs unterscheidet sich deutlich zwischen der Hefe- und der Hyphenform [178]. Dementsprechend löst die Hyphenform eine andersartige, schwächere Immunreaktion aus als die Hefeform. Zu den CWPs zählen auch die CRASPs (*complement regulator acquiring surface proteins*). Diese Proteine rekrutieren Komplementregulatoren

an die Oberfläche von *C. albicans* und vermitteln so eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Hefe gegen komplementabhängige Opsonisierung und Phagozytose (s.u.).

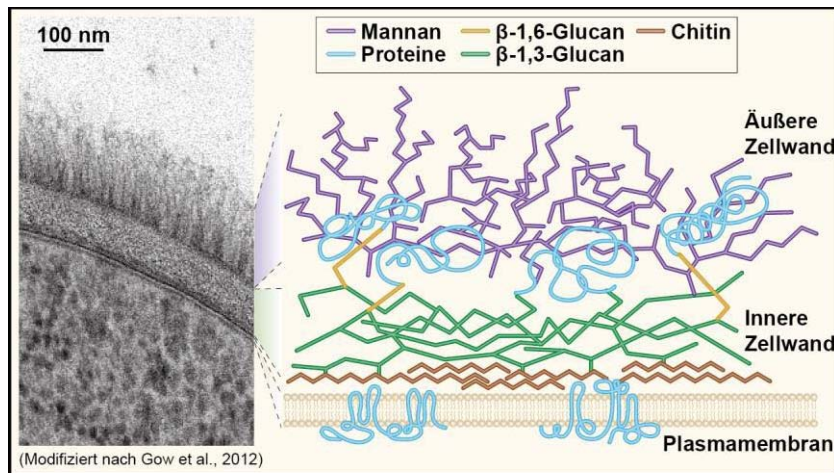


Abbildung 1.4: Aufbau der Zellwand von *C. albicans*

Die Zellwand von *C. albicans* umhüllt die Pilzzelle und besteht aus zwei Schichten. Die innere Zellwand besteht aus einer Lage Chitin, welche von einer Schicht β -1,3-Glucan überlagert ist. Es folgt die äußere Zellwand, welche aus Mannosepolymeren (Mannanen) besteht. In die äußere Zellwand sind Proteine eingebettet, welche an der inneren Zellwand verankert sind [176].

Adhäsion

Der erste Schritt der Infektion mit *C. albicans* ist die Kolonisation der Körperoberflächen. Dabei adhären die Pilzzellen an Epithelien. Zu diesem Zweck verfügt *C. albicans* über spezifische Zellwandproteine, die Adhäsine. Hierzu zählen die Als-Familie (*agglutinin-like sequence*), Hwp1 (*hyphal cell wall protein 1*) sowie Int1 (*integrin-like protein 1*) [179]. Adhärenente Zellen von *C. albicans* sind zumeist Hefezellen, entwickeln sich jedoch im Laufe der Gewebsinvasion zu Hyphen.

Gewebsinvasion

Die Gewebsinvasion von *C. albicans* ist mit der morphologischen Transformation von der Hefe- zur Hyphenform assoziiert [180–182]. Um eine Epithelschicht zu durchdringen, bildet *C. albicans* Hyphen und bedient sich darüber hinaus zweier Strategien: Der aktiven Penetration und der induzierten Endozytose [183–185]. Zur aktiven Penetration sezernieren die Pilzzellen Enzyme wie SAPs (*secreted aspartic proteases*) und Lipasen oder rekrutieren Proteasen wie Plasmin, welche die Epithelzellen sowie die extrazelluläre Matrix schädigen. In der Folge wird die Integrität des Epithels geschädigt und die Candidazellen können dieses durchdringen [186–188]. Andererseits induzieren Candidazellen ihre Endozytose in die Epithelzellen, wobei Hyphen effizienter sind als Hefezellen [181, 185, 189]. Die Endozytose in Epithelzellen dient zudem der Immunevasion, da die aufgenommenen Candidazellen vor Attacken des Immunsystems geschützt sind [190]. In der Folge treten die Zellen auf der basalen Seite

der Zellen wieder aus und erreichen die Blutbahn [176]. Über den Blutkreislauf verbreiten sich die Candidazellen im ganzen Organismus. Hierbei dominiert wiederum die Hefeform [176]. Um den Blutkreislauf zu verlassen und in weitere Gewebe einzudringen, penetriert *C. albicans* das Endothel. Hierzu bedient sich der Pilz wiederum der o.g. Strategien der aktiven Penetration und der induzierten Endozytose. Einen weiteren Mechanismus zur Gewebsinvasion stellt die Aufnahme von *C. albicans* in Leukozyten dar. Überdauern die Candidazellen im Inneren der Leukozyten, dienen diese als Transportvehikel zur Passage durch epitheliale und endotheliale Barrieren [191].

Biofilmbildung

Die Bildung von Biofilmen stellt einen effizienten Schutzmechanismus von *C. albicans* vor der Immunreaktion dar. Der Biofilm besteht aus Candidazellen (Hefen und Hyphen), kommensalen Bakterien und ist über Keratin vernetzt [192]. Innerhalb des Biofilms sind die Candidazellen vor Angriffen durch Phagozyten geschützt. Auch Antimykotika dringen nur schlecht in den Biofilm ein und können daher die Pilzzellen nicht effektiv schädigen [193]. Biofilme finden sich vor allem an zentralen venösen Kathetern und in der Mundhöhle, aber auch bei einer durch Candida ausgelösten Endokarditis [193].

1.4.2. Komplementevasion von *C. albicans*

Erreichen Candidazellen nach erfolgreicher Überwindung der Epithelbarriere den Blutkreislauf, erfolgen unverzüglich Reaktionen des Immunsystems, insbesondere durch das Komplementsystem. Die Aktivierung der Komplementkaskade auf der Oberfläche von *C. albicans* führt zur Opsonisierung der Pilzzellen und deren Phagozytose. Darüber hinaus werden Anaphylatoxine freigesetzt, welche weitere Effektorzellen rekrutieren. In der Folge wird die adaptive Immunantwort aktiviert und so der eingedrungene Erreger effektiv bekämpft.

Candida albicans verfügt über eine Vielzahl von Mechanismen um sich vor Schädigung durch die Komplementkaskade zu schützen. So exprimiert der Pilz Oberflächenproteine, welche lösliche Komplementregulatoren rekrutieren (*complement regulator acquiring surface proteins*, CRASPs). Es wurden CRASPs identifiziert, die die Regulatoren Faktor H, FHL-1, C4BP und Plasminogen binden (Gpm1 (*phosphoglycerate mutase*) [194], Pra1 (*pH-regulated antigen 1*) [195–197], Gpd2 (*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2*) [198] und Hgt1p (*high-affinity glucose transporter 1*) [199]). Die rekrutierten Komplementregulatoren sind funktionell aktiv und dämpfen die Komplementreaktion auf oder in direkter Nähe der Oberfläche von *C. albicans*. Auf diese Weise werden die Opsonisierung und nachfolgende Komplementeffekte auf *C. albicans* vermindert [200]. Die Rekrutierung von Komplementregulatoren wurde auch für andere Mikroorganismen als Evasionsmechanismus der Komplementreaktion beschrieben (Bakterien [201–204], Viren [205], Parasiten [206, 207], Pilze [208, 209]). Das Oberflächenprotein $\alpha_v\beta_3$

integrin-like protein von *C. albicans* bindet den Komplementregulator Vitronektin [210]. Dies ermöglicht die Inhibition der Bildung des terminalen Komplementkomplexes (TCC). Die Bindung von Vitronektin an *C. albicans* wurde auch in vivo gezeigt [211].

Von *C. albicans* gebildete SAPs (*secreted aspartyl proteases*) sind neben der Gewebsinvasion (s.o.) auch an der Komplementevasion beteiligt. So spalten SAPs die Komplementproteine C3b, C3b und C5b und inhibieren so die Komplementkaskade auf mehreren Ebenen [212]. Das CRASP Pra1 wird von *C. albicans* sezerniert und bindet lösliches C3. Dadurch wird die Aktivierung von C3 durch die C3-Konvertase inhibiert [213].

1.4.3. Evasion der zellulären Immunreaktionen

Neben der Modulierung der humoralen Komponente des angeborenen Immunsystems beeinflusst *C. albicans* auch die Aktivierung von Zellen im Laufe der Immunreaktion. Hierbei spielen die CWPs der Pilzzellen sowie deren Exposition auf Hefe- und Hyphenzellen eine Rolle. So wird auf Hyphenzellen das β -Glucan durch Mannan abgeschirmt und kann so nicht von PRRs (Dectin-1) erkannt werden und keine Immunreaktion auslösen [214]. Weiterhin aktivieren MAMPs auf Hyphenzellen selektiv TLR2, im Gegensatz zu Hefezellen jedoch nicht TLR4. Dies hat eine verringerte Expression von IFN- γ zur Folge und damit eine verminderte Differenzierung von Th1-Zellen [215]. Stattdessen wird die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen gefördert [216].

Das sezernierte Protein Pra1 bindet an die Komplementrezeptoren 3 (CR3) und 4 (CR4) auf humanen Leukozyten und trägt so zum Überleben des Pilzes bei [217], möglicherweise durch Blockade der CR3-vermittelten Phagozytose von *C. albicans* [202].

Phagozytierte Candidazellen ermöglichen das eigene Überleben innerhalb der Phagozyten, indem sie ihren gesamten Metabolismus umstellen. Dies umfasst verlangsamtes Wachstum, die Erschließung anderer Nahrungsquellen und insbesondere die Reaktion auf oxidativen Stress [218]. So produziert *C. albicans* Flavohämoglobin, welches das fungizide NO (Stickstoffmonoxid) neutralisiert [219].

1.4.4. Humorale Immunreaktion auf *C. albicans*

Lange Zeit herrschte die Meinung vor, dass Antikörper für die Abwehr von Pilzinfektionen keine Rolle spielen [220, 221]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass sowohl B-Zellen als auch die von ihnen gebildeten Antikörper eine protektive Rolle gegen Pilzinfektionen spielen, insbesondere für *C. albicans* [222–225]. Die gegen *C. albicans* produzierten Antikörper richteten sich gegen Oberflächenantigene wie β -Glucan [226], Als3 [227], Sap2 (s.o., [228]) oder Mannan [229].

Die Wirkmechanismen der Anti-Candida-Antikörper werden unterteilt in direkte und indirekte Mechanismen. Direkte Mechanismen umfassen die Inhibition des Pilzwachstums [226, 230] sowie die direkte fungizide Wirkung der Antikörper [231–233]. Darüber hinaus wurden Antikörper beschrieben, deren Bindung an die Pilzzelle deren Metabolismus derartig beeinflusste, dass das Pathogen an Virulenz verlor [234]. Indirekte Wirkmechanismen beinhalten die Verstärkung der Phagozytose [235], die Aktivierung des Komplementsystems [236] sowie Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) [237]. Darüber hinaus werden auch neutralisierende Antikörper gegen sezernierte Faktoren (z.B. Saps, Toxine) der Pathogene gebildet [228].

Die Effektivität von Antikörpern gegen fungale Infektionen rückt die Möglichkeit einer Impfung gegen derartige Pathogene in den Focus des Interesses [238]. Es wurden Kandidatenantigene für eine Impfung identifiziert [226, 228, 239] sowie die Möglichkeit einer passiven Immunisierung untersucht [240]. Mehrere Impfkandidaten werden in klinischen Studien getestet [241]. Hierbei ist von Interesse, dass konservierte Oberflächenantigene wie β -1,3-Glucan auf verschiedenen fungalen Pathogenen vorkommen und somit eine Spezies-übergreifende Immunisierung ermöglicht werden könnte [226].

1.5. Translation elongation factor 1 (Tef1)

Der eukaryotische Elongationsfaktor 1 alpha (*eukaryotic elongation factor 1 alpha*, eEF1 α) ist Bestandteil der eukaryotischen Proteinsynthesemaschinerie. Es ist das Analogon zum prokaryotischen Translationsfaktor EF-Tu und vermittelt den Transport von mit Aminosäuren beladener tRNA zum Ribosom [242]. Inaktives eEF1 α -GDP bindet an eEF1 $\beta\gamma$ (EF1-Komplex). eEF1 $\beta\gamma$ ist ein GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) und katalysiert die Dissoziation von eEF1 α -GDP. So kann eEF1 α GTP binden. eEF1 α -GTP bindet eine mit einer Aminosäure beladene tRNA und transloziert zum Ribosom. Dort bindet die tRNA zum passenden Anticodon in der A-Stelle und die Aminosäure wird mit der wachsenden Peptidkette verknüpft. GTP von eEF1 α wird hydrolysiert und eEF1 α -GDP dissoziiert vom Ribosom, um vom EF1-Komplex erneut mit GTP beladen zu werden (Abbildung 1.5) [1].

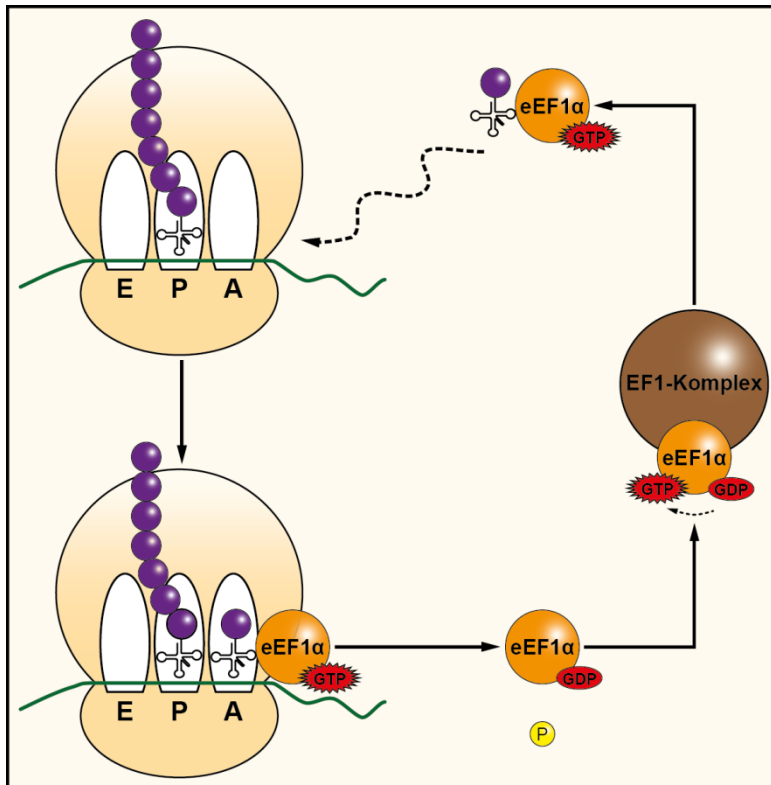


Abbildung 1.5: eEF1α in der eukaryotischen Proteinsynthese

eEF1α ist ein G-Protein und bindet mit einer Aminosäure beladene tRNA. eEF1α vermittelt den Transport der beladenen tRNA zum Ribosom. Im Zuge der Verknüpfung der Aminosäure mit der wachsenden Polypeptidkette wird das an eEF1α gebundene GTP hydrolysiert. eEF1α-GDP bindet an den EF1-Komplex, wird dort mit GTP beladen und steht so erneut für den Transport von Aminosäuren zur Verfügung.

In *C. albicans* wird der eEF1α als *translation elongation factor 1 alpha* (*Tef1*) bezeichnet. Tef1 ist ein Protein von 458 Aminosäuren (Molekülmasse ca. 50 kDa), bestehend aus einer einzelnen Polypeptidkette [243]. Es existieren zwei Gene, *TEF1* und *TEF2*, die beide für ein identisches Polypeptid codieren [244]. Beide Gene werden gleichsam transkribiert und translatiert [243]. Das Protein ist essentiell für den Organismus; eine Mutante in der beide Gene ausgeknockt sind ist nicht lebensfähig [245]. Es wird sowohl im Zytoplasma als auch als Zellwandprotein exprimiert [246]. Das CWP bindet Plasminogen [186]. Es wurde gezeigt, dass die Expression des *TEF1*-Gens erhöht ist, wenn *C. albicans* Zellen infiziert [247]. Werden Candidazellen von Makrophagen phagozytiert, steigt die Expression von *TEF1* ebenfalls an [218].

2. Fragestellung

Die humanpathogene Hefe *Candida albicans* ist ein opportunistisches Pathogen und ein verbreiteter nosokomialer Keim. Infektionen mit *C. albicans* befallen vor allem Patienten mit geschwächtem Immunsystem sowie Kinder und ältere Menschen. Ein Charakteristikum dieser Hefe ist es, dass es den Angriffen des menschlichen Immunsystems sehr große Widerstandsfähigkeit entgegenbringt und im Organismus überdauern kann. Die Mechanismen der Immunevasion von *C. albicans* sind bisher nur zum Teil verstanden. Es ist bekannt, dass die Hefe über CRASPs (*complement regulator acquiring surface proteins*) verfügt. Diese wirken mittels der Rekrutierung von Komplementregulatoren an die Oberfläche des Pilzes dessen Erkennung und Bekämpfung durch das Komplementsystem entgegen. Die Existenz mehrerer CRASPs zeigt, dass es sich hierbei um ein mehrfach redundantes System handelt und das Komplementsystem eine Schlüsselrolle in der Immunreaktion gegen *C. albicans* spielt.

In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion des Candida-Proteins Tef1 (*Translation Elongation Factor 1 alpha*) näher charakterisiert werden. Tef1 wurde zuvor als potentielles CRASP beschrieben [186, 248]. Weiterhin soll hier auf funktioneller Ebene der Knockout-Stamm *tef1Δ/Δ* hinsichtlich seines Komplement- und Immunevasionsvermögens untersucht werden.

Das Komplementsystem ist nicht allein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, sondern vielfach mit Zellen des adaptiven Immunsystems vernetzt. Von besonderer Bedeutung ist die Costimulation von B-Zellen durch die Komplementproteine C3dg und C3d. Es ist bekannt, dass Pathogene spezifisch B-Zellen und B-Zell-abhängige Mechanismen inhibieren und dies zur Persistenz der Erreger im Wirtsorganismus beiträgt. Die Rolle der B-Zell-vermittelten Immunreaktion für die Bekämpfung von *C. albicans* ist bisher nur wenig untersucht worden. Neuere Studien zeigen jedoch die Wichtigkeit B-Zell-abhängiger Mechanismen bei der Abwehr von Pilzinfektionen. In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob und wie Tef1 von *C. albicans* die B-Zell-vermittelte Immunreaktion beeinflusst und so zur Evasion der adaptiven Immunreaktion durch diesen Erreger beiträgt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Substanzen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.1.1. Medien

LB

5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Trypton
10 g/l	NaCl
pH 7,2	

LB-Agar

1,5 % [w/v]	Agar
in LB-Medium	

YPD

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Pepton
20 g/l	Glucose
pH 7,0	

YPD-Agar

1,5 % [w/v]	Agar
in YPD-Medium	

Zellkulturmedium

10 ml/l	Ultraglutamin
500 µl/l	Gentamicin
10 % [v/v]	Fetal Calve Serum
in RPMI 1640	

HUVEC-Zellkulturmedium

10 ml/l	Ultraglutamin
500 µl/l	Gentamicin
10 % [v/v]	Fetal Calve Serum
in DMEM	

Raji-Zellkulturmedium

10 ml/l	Ultraglutamin
500 µl/l	Gentamicin
10 % [v/v]	Fetal Calve Serum
10 ml/l	Natriumpyruvat
10 ml/l	Nicht-essentielle Aminosäuren
in RPMI 1640	

3.1.2. Puffer*PBSII*

140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4	

TBS

20 mM	Tris
137 mM	NaCl

Carbonatpuffer (Immobilisierung)

0,05 M	Carbonat-Bicarbonat
pH 9,6	

Carbonatpuffer (FITC-labelling)

0.1 M	Na ₂ CO ₃
0.15 M	NaCl

Elutionspuffer (Immunopräzipitation)

50 mM	Glycin
pH 2,7	

Elutionspuffer (CEWA)

60 mM	Tris
25 %	Glycin
2 %	SDS
pH 6,5	

Assaypuffer (Zytokinbestimmung)

10 % FCS	
In DPBS (-Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	

MACS-Puffer

2 mM EDTA	
1 % BSA	
In DPBS (-Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	

Lysepuffer (Raji-Stimulation)

20 mM	Tris-HCl	
150 mM	NaCl	
1 mM	Na ₂ EDTA	
20 mM	NaF	
1 % [v/v]	Triton X-100	
2.5 mM	Na ₄ P ₂ O ₇	
1 mM	Na ₃ VO ₄	
1 x	Complete®	Proteaseinhibitor

Expression in E. coli*Lysepuffer*

50 mM	Tris	
100 mM	NaCl	
5 mM	EDTA	
0,5 %	Triton X100	
0,01 %	NaN ₃	
1 mM	DTT	
1 x	Complete®	Prote-
	aseinhibitor	
pH 8,0		

Dispersionspuffer

100 mM	Tris
50 mM	Glycin
8 M	Harnstoff
5 mM	GSSH
0,5 mM	GSSG

Sonifizierungspuffer

100 mM	Tris
50 mM	Glycin

Bindungspuffer

10 mM	Tris
100 mM	NaH ₂ PO ₄
8 M	Harnstoff

Waschpuffer I

10 mM	Tris
100 mM	NaH ₂ PO ₄
8 M	Harnstoff
25 mM	Imidazol

Elutionspuffer I

10 mM	Tris
100 mM	NaH ₂ PO ₄ ,
8 M	Harnstoff
250 mM	Imidazol

Waschpuffer II

20 mM	Tris
500 mM	NaCl
6 M	Harnstoff
20 mM	Imidazol
1 mM	2-Mercaptoethanol
pH 8,0	

Rückfaltungspuffer

20 mM	Tris
500 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
1 mM	2-Mercaptoethanol
pH 8,0	

Elutionspuffer II

20 mM	Tris
500 mM	NaCl
500 mM	Imidazol
1 mM	2-Mercaptoethanol
pH 8,0	

SDS-PAGE/Western Blot*Sammelgelpuffer*

500 mM Tris
 0,4 % SDS
 pH 6,8

Trenngelpuffer

1,5 M Tris
 0,4 % SDS
 pH 8,8

Laufpuffer

25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1 % SDS

Transferpuffer (Western Blot)

25 mM Tris
 200 mM Glycin
 15 % Methanol

Mikroskopie*HEPES-Puffer*

0,1 M HEPES
 10 % Raji-Zellkulturmedium
 10 % Saccharose
 pH 7,4

Fluoreszenzmarkierung von Zellen*Carbonatpuffer*

0,15 M NaCl
 0,1 M Na₂CO₃
 pH 9,0

Durchflusszytometrie*Waschpuffer*

0,1 % BSA
 0,1 % NaN₃
 In DPBS (-Ca²⁺/Mg²⁺)

3.1.3. Chemikalien

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Zulieferer
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Blocking Buffer I	AppliChem, Darmstadt
Brefeldin A	eBioscience, San Diego, CA, USA
Calcofluor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CellTiter-Blue®	Promega, Mannheim
CellTrace™ Violet	Thermo, Waltham, MA, USA
Complete® Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
CpG	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Cross-Down Buffer	AppliChem, Darmstadt
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Lonza, Verviers, Belgien
DPBS (+Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Lonza, Verviers, Belgien
DPBS (-Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Lonza, Verviers, Belgien
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll-paque™ PLUS	GE Healthcare, Frankfurt am Main
FITC	Carl Roth, Karlsruhe
Fixable Viability Dye eFluor® 780	eBioscience, San Diego, CA, USA
Fluorescein Isothiocyanat, Isomer I (FITC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gentamicin (Gentamicine sulfate)	Biozym, Hessisch Oldendorf
HBSS	Lonza, Verviers, Belgien
IL-2	ImmunoTools, Friesoythe
IL-10	ImmunoTools, Friesoythe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe

Lysozym	Thermo, Waltham, MA, USA
Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
Phorbol Myristate Acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Plasminogen	Technoclone, Wien, Österreich
Pokeweed Mitogen (PWM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti-load 1	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Lonza, Verviers, Belgien
Tissue plasminogen activator (tPA)	Technoclone, Wien, Österreich
Ultraglutamine 1	Biozym, Hessisch Oldendorf
Vybrant® DiD cell-labeling solution	Thermo, Waltham, MA, USA
CD35 (CR1)	R&D, Minneapolis, USA
CD22	SinoBiological, Peking, VR China
CD40	SinoBiological, Peking, VR China
CD21 (CR2)	Rekombinant exprimiert

3.1.4. Antikörper/-seren

Tabelle 3.2: Verwendete Antikörper/-seren

Spezies	Reaktivität	Konjugat	Artikelnummer	Zulieferer
pAb rabbit	Tef1			[248]
mAb mouse	Tef1			Niklas Beyersdorf, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
pAb goat	FH		A237	Complement Technology, Tyler, TX, USA
mAb mouse	FH SCR20 (C18)			[35]
pAb goat	C3		A213	Complement Technology, Tyler, TX, USA
mAb mouse	C3d		A207	Quidel, San Diego, CA, USA
pAb rabbit	C3d		A0063	Dako, Glostrup, Dänemark
pAb sheep	C4BP		ab8788	abcam, Cambridge, MA, USA
pAb goat	Properdin		A260	Complement Technology, Tyler, TX, USA
pAb goat	Plasminogen			Acris Antibodies GmbH, Herford
mAb mouse	beta actin		GTX109639	GeneTex, Irvine, CA, USA
mAb mouse	penta His			Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
pAb rabbit	His	HRP	3894	Carl Roth, Karlsruhe
mAb rabbit	phospho CD19		3571	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
pAb rabbit	pan CD19		3574	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
mAb mouse	phospho Akt		4058	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
pAb rabbit	pan Akt		7272	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
mAb mouse	CD3		16-0037-85	eBioscience, San Diego, CA, USA
mAb mouse	CD21 (CR2)		sc-18857	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
mAb mouse	CD22		ABIN1106078	antibodies-online, Aachen
mAb mouse	CD28		16-0289-81	eBioscience, San Diego, CA, USA

mAb mouse	CD35 (CR1)		MA5-17711	Thermo, Waltham, MA, USA
mAb mouse	CD40		GTX14148	GeneTex, Irvine, CA, USA
mAb mouse	IL-10	Biotin	Kit 555157	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
mAb mouse	IFN- γ	Biotin	Kit 555212	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
mAb mouse	TNF	Biotin	Kit 555142	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
pAb rabbit	IgM	Biotin	2022-08	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
pAb rabbit	IgA/G/M		109-006-064	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
mAb mouse	CD40		MAB6321	R&D, Minneapolis, USA
pAb goat	rabbit	HRP	P0448	Dako, Glostrup, Dänemark
pAb rabbit	goat	HRP	P0449	Dako, Glostrup, Dänemark
pAb goat	mouse	HRP	P0447	Dako, Glostrup, Dänemark
mAb mouse	CD4	PE	300508	BioLegend, London, UK
mAb mouse	CD19	BV421	302234	BioLegend, London, UK
mAb mouse	CD24	FITC	11-0247	eBioscience, San Diego, CA, USA
mAb hamster	CD27	APC	A16220	Thermo, Waltham, MA, USA
mAb mouse	CD38	PE	356603	BioLegend, London, UK
mAb mouse	IgD	PE	348203	BioLegend, London, UK
pAb goat	IgG	HRP	A6029	Sigma, Taufkirchen
mAb rat	IL-10	PE	501404	BioLegend, London, UK
mAb rat	IL-10	Alexa Fluor®488	501413	BioLegend, London, UK
pAb rabbit	β -actin		GTX109639	GeneTex, Irvine, CA, USA
goat	rabbit	Alexa Fluor®647	A21246	Thermo, Waltham, MA, USA
donkey	mouse	Alexa Fluor®488	A21202	Thermo, Waltham, MA, USA
donkey	rabbit	Alexa Fluor®488	A21206	Thermo, Waltham, MA, USA
goat	mouse	Alexa Fluor®647	4410S	Cell Signalling, Danvers, MA, USA

3.1.5. Sonstiges

Geräte

Tecan safire² (Tecan Group, Männedorf, Schweiz)

BD LSRII (BD Biosciences, Heidelberg)

Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen)

Casy 2 (Schärfe System, Reutlingen)

TransBlot Turbo Transfer System (BioRad, Hercules, CA, USA)

Software

Prism® 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA)

BLItz Pro™ 1.2 Software (Pall ForteBio Europe, Portsmouth, Vereinigtes Königreich)

FlowJo 7.2.5 (Flowjo LLC, Ashland, OR, USA)

FACSDiva 6.2 (BD Biosciences, Heidelberg)

ZEN 2011 SP3 (black edition) Version 8.1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena)

Kits

OptEIA™ Set, human IL-10 (BD Biosciences, Heidelberg)

OptEIA™ Set, human IFN-γ (BD Biosciences, Heidelberg)

OptEIA™ Set, human TNF (BD Biosciences, Heidelberg)

ELISA MAX™ Standard Set IL-2 (BioLegend, London, UK)

B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

3.2. Methoden

3.2.1. Mikrobiologische Arbeiten

Tabelle 3.3: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BWP17	<i>ura3::λimm434/ura3::λimm434</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i>	[248]
<i>tef1Δ/Δ</i>	<i>tef1::ARG/tef1::HIS+Clp10 (URA)</i>	[248]
<i>tef1Δ/Δ::TEF1</i>	<i>tef1::ARG/tef1::HIS+Clp10+TEF1</i> (orf19.1435, URA)	[248]

Kultivierung von Mikroorganismen

Candida albicans wurde zur Langzeitaufbewahrung in Form von Kryokulturen bei -80 °C gelagert. Die Kryokulturen enthielten zur Vermeidung von Frostschäden 30 % Glycerin. Ausgehend von einer Kryokultur wurden *C. albicans*-Zellen mit einer Impföse auf YPD-Agar ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C herangezogen. Daraufhin hatten sich vereinzelt Kolonien auf der Platte gebildet, welche zur Anlage von Flüssigkulturen verwendet wurden. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie in eine 50 ml-Kulturflasche mit 10 ml YPD-Flüssigmedium überführt und bei 30 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert.

Gewinnung von *C. albicans*-Lysaten

Die Zellen einer *C. albicans*-Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 2000 x g, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml DPBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit ca. 500 µl Glasperlen (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und für eine Minute in einer Kugelmühle bei 4 m/s geschüttelt. Das entstandene Lysat wurde zentrifugiert (1 min, 16000 x g, RT) und das Sediment (Zelltrümmer, Glasperlen) verworfen. Die Lysate wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Gewinnung von Kulturüberständen von *C. albicans*

Die Zellen einer *C. albicans*-Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 2000 x g, RT) und das Zellpellet verworfen. Die Überstände wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Expression von Tef1 in *E. coli*

Das für Tef1 codierende Gen aus *C. albicans* wurde in den Expressionsvektor pET101 kloniert. Dieser Vektor codiert im Anschluss an das einklonierte Gen für einen His₆-tag, welcher dem Genprodukt C-terminal angefügt wird und vermittelt weiterhin eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. Der Expressionsvektor wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Star

(DE3) hineintransformiert. Das bei der Expression entstehende Protein fällt in unlöslichen Proteinaggregaten an („*inclusion bodies*“).

Zur Proteinexpression wurden Bakterienkulturen aus Kryokulturen (-80 °C) auf LB-Agarplatten (+100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Bakterien wurden in LB-Medium (+100 µg/ml Ampicillin) überführt und inkubiert (4 h, 200 rpm, 37 °C). Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Bakterien inkubiert (4 h, 200 rpm, 37 °C). Die Bakterienzellen wurden sedimentiert (10 min, 6500 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Zellysate wurden mit 10 mM MgSO₄ versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 0,1 mg/ml Lysozym wurden hinzugefügt, inkubiert (30 min, 37 °C), anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (20 min, 10000 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Sonifizierungspuffer aufgenommen und für 20 Minuten mit Ultraschall behandelt. Das Produkt wurde in Dispersionspuffer eingebracht und über Nacht bei 4 °C gerührt und so die Proteinaggregate (*inclusion bodies*) vollständig denaturiert und in Lösung überführt. Das denaturierte, rekombinante Tef1 wurde nun über seinen His₆-Tag an eine Nickelmatrix (Thermo, Waltham, MA, USA) gebunden, Verunreinigungen mit Waschpuffer I ausgewaschen und das Protein eluiert (Elutionspuffer I). Der Elutionspuffer wurde mittels Ultrafiltration abgetrennt und durch Bindungspuffer ersetzt. Das rekombinante Tef1 wurde erneut über seinen His₆-Tag an die Nickelmatrix einer Chromatographiesäule (HisTrap™ HP, GE) gebunden und diese an ein ÄKTA™-System angeschlossen. Im Folgenden wurde das Protein gewaschen (Waschpuffer II), durch langsamen Pufferaustausch zurückgefaltet (Rückfaltungspuffer) und eluiert (Elutionspuffer II). Der Elutionspuffer wurde mittels Ultrafiltration abgetrennt und durch DPBS ersetzt.

3.2.2. Proteinbiochemische Arbeiten

SDS-PAGE

Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit denaturierendem Probenpuffer (roti-load 1) vermischt und inkubiert (10 min, 350 rpm, 99 °C). Die Proben wurden in die Taschen eines Polyacrylamidgels aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der Proteine ist hierbei antiproportional zur Migrationsgeschwindigkeit im Gel. Die Auftrennung verlief bei 150 V für 70 Minuten.

Western Blot

Die im Acrylamidgel befindlichen Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde das Gel in einen Sandwichaufbau eingebracht. Dieser setzte sich zusammen aus: Anode – Filterpapier (3 Lagen) – Nitrozellulosemembran – Acrylamidgel – Filterpapier (3 Lagen) – Kathode. Filterpapiere, Membran und Acrylamidgel wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Durch Anlegen einer Spannung zwischen Anode und

Kathode bewegten sich die Proteine im elektrischen Feld aus dem Gel in Richtung Anode und setzten sich in der Membran fest. Hier wurde ein Semi-Dry-Blotverfahren angewendet (Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad). Der Transfer verlief für 30 Minuten bei 12 V und maximal 1 A.

ELISA

Die zu untersuchenden Proteine wurden in Carbonatpuffer verdünnt in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (HiBind, Sarstedt) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Die Platte wurde dreimal mit PBSII + 0,05 % Tween gewaschen. Ungesättigte Bindungsstellen wurden durch eine Blocklösung besetzt (1 h, RT) und die Platte erneut dreimal gewaschen. Das Ligandenprotein wurde hinzugefügt, für eine Stunde inkubiert und die Platte erneut dreimal gewaschen. Gebundenes Protein wurde mittels eines spezifischen Primärantikörpers (1 h, RT) sowie eines korrespondierenden, HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:2000 verdünnt; 1 h, RT) detektiert. Die Proben wurden mit TMB-Substratlösung versetzt. Das enthaltene TMB wird von HRP unter Bildung eines blauen Farbniederschlags umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,25 M Schwefelsäure gestoppt und das entstandene Produkt durch Messung der Absorbanz bei 450 nm quantifiziert (Tecan safire², Tecan Group, Männedorf, Schweiz).

CEWA

Die zu untersuchenden Proteine wurden in Carbonatpuffer verdünnt in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (HiBind, Sarstedt) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Die Platte wurde dreimal mit PBSII + 0,05 % Tween gewaschen. Ungesättigte Bindungsstellen wurden durch eine Blocklösung besetzt (1 h, RT) und die Platte erneut dreimal gewaschen. Als Ligand wurde NHS (*Normal Human Serum*, humanes Serum) in verschiedenen Konzentrationen (verdünnt in DPBS, versetzt mit 10 mM EDTA) hinzugefügt, für eine Stunde inkubiert und die Platte erneut dreimal gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit Elutionspuffer abgelöst (15 min, 400 rpm, 37 °C), die Proben mit reduzierendem Probenpuffer (roti-load 1) versetzt und bei 95 °C und 400 rpm für 5 Minuten verkocht. Im Anschluss wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Ligandenproteine mittels Western Blot detektiert.

Immunpräzipitation

Magnetische Mikrokügelchen (Dynabeads Protein G, Life Technologies) wurden in einem Reaktionsgefäß mittels eines starken Magnetfelds immobilisiert und gewaschen. Hierzu wurde der Überstand verworfen, die Kügelchen außerhalb des Magnetfelds in DPBS resuspendiert und inkubiert (5 min, RT). Anschließend wurden die Kügelchen im Magnetfeld sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Kügelchen wurden mit einem Antikörper (1:100 verdünnt in DPBS) versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Mikrokügelchen wurden erneut unter Zuhilfenahme des Magnetfeldes gewaschen (2 x, 5 min, PBSII) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Ligandenproteine wurden verdünnt in DPBS hinzugefügt und

für eine Stunde bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Die Mikrokügelchen wurden erneut gewaschen (2 x, DPBS). Die gebundenen Proteine wurden mittels eines Elutionspuffers von den Mikrokügelchen abgelöst (10 min, 400 rpm, 37 °C). Die Mikrokügelchen wurden im Magnetfeld immobilisiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit reduzierendem Probenpuffer (roti-load 1) versetzt und 10 Minuten bei 350 rpm und 99 °C verkocht. Im Anschluss wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Ligandenproteine mittels Western Blot detektiert.

Biolayer Interferometry

Ni-NTA-Biosensoren (Pall ForteBio Europe, Portsmouth, Vereinigtes Königreich) wurden bei Raumtemperatur für 30 Sekunden mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Sensoren für 120 Sekunden mit Ligandenprotein (verdünnt in DPBS) beladen. Ungebundene Proteine wurden durch 30-sekündiges Waschen mit DPBS entfernt. Danach wurden die Sensoren für 240 Sekunden mit dem Analyten in den verschiedenen Konzentrationen (verdünnt in DPBS) inkubiert. Anschließend wurden die Ni-NTA-Biosensoren erneut für 30 Sekunden mit DPBS gewaschen. Die Dissoziation der Proteinkomplexe wurde über einen Zeitraum von 240 Sekunden evaluiert. Die Bindungssignale wurden gegen die Werte einer Kontrolle normalisiert, welche DPBS als Analyten verwendete. Die Dissoziationskonstante K_D wurden mithilfe der BLItz Pro™ 1.2 Software (Pall ForteBio Europe, Portsmouth, Vereinigtes Königreich) bestimmt.

Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Das zu markierende Protein wurde mit einer dreifach höheren Konzentration von Alexa Fluor®647 (Thermo, Waltham, MA, USA), verdünnt in labelling buffer (NanoTemper Technologies, München), im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde mittels Gelfiltration entfernt. Hierzu wurden Gelfiltrations-säulen (emp BIOTECH, Berlin) mit der Protein-Farbstoff-Lösung beladen und zentrifugiert (1', 1000 x g, RT). Der Durchfluss enthielt das fluoreszenzmarkierte Protein, während ungebundene Farbstoffmoleküle in der Säule zurückblieben.

3.2.3. Zellkultur

Isolation neutrophiler Granulozyten aus Buffy-Coats

Die *Buffy-Coats* (Leukozytenkonzentrate) gesunder Spender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena bezogen. Die Isolierung polymorphonukleärer Leukozyten aus Leukozytenkonzentraten verlief wie beschrieben [249]. In Kürze: Leukozytenkonzentrat wurde mit 3 %iger Dextran T500-Lösung im Verhältnis 5:1 gemischt und für 25 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, sodass die enthaltenen Erythrozyten sedimentieren konnten. Der Überstand wurde zentrifugiert (20 min, 200 x g, RT) und das erhaltene

Zellpellet in HBSS aufgenommen. Mit dieser Zellsuspension wurden 15 ml Ficoll-paque™ PLUS (GE Healthcare, Frankfurt am Main) überschichtet und zentrifugiert (25 min, 400 x g, RT). Das entstandene Zellpellet wurde in eiskaltem Lysepuffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 10 mM EDTA, pH 7,4) aufgenommen, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren und die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4 °C). Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen.

Für den Phagozytoseassay wurden Neutrophile mit DiD angefärbt. Hierzu wurden die Zellen mit DiD (1:250) versetzt und inkubiert (20 min, 37 °C). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen.

Kultivierung von Raji-Zellen

Raji-Zellen wurden in Zellkulturmedium (für Raji-Zellen) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 72 bis 96 Stunden wurden die Zellen sedimentiert (5 min, 800 x g, RT), in frischem Medium aufgenommen und bei einer Dichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

Kultivierung von HUVEC-Zellen

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) wurden in HUVEC-Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 72 bis 96 Stunden wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin-EDTA (5 min, 37 °C, 5 % CO₂) abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und bei einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Für Versuche zur Zellschädigung wurden Zellen in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, flacher Boden) bei einer Dichte von $1,2 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung in 100 µl HUVEC-Zellkulturmedium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 bis 72 Stunden inkubiert. In dieser Zeit bildeten die Zellen eine konfluente Zellschicht aus (*monolayer*).

Isolation von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) aus *Buffy-Coats*

Buffy-Coats wurden im Verhältnis 1:4 mit DPBS + 2 mM EDTA verdünnt und mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Gradienten in Fraktionen aufgetrennt. 15 ml Ficoll-Paque (GE) wurde mit 35 ml verdünntem Leukozytenkonzentrat überschichtet und für 30 min bei 400 x g und RT zentrifugiert. Die mononukleäre Zellschicht wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit je 50 ml DPBS + 2 mM EDTA gewaschen (1 x 300 x g, 2 x 200 x g; je 10 min, RT). Die PBMCs wurden in DPBS + 2 mM EDTA aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Casy, Schärfe System, Reutlingen)

Isolation von B-Zellen aus PBMCs

Die Isolation von B-Zellen aus PBMCs erfolgte mittels negativer Selektion unter Verwendung des MACS B-Zell-Isolationskits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers. 5×10^7 PBMCs wurden in 200 µl MACS-Puffer (DPBS + 2 mM EDTA + 1 % BSA)

aufgenommen, mit 50 µl biotinyliertem Antikörpercocktail versetzt und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl MACS-Puffer sowie 100 µl anti-Biotin-Metallkügelchen hinzugefügt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf eine zuvor mit MACS-Puffer gewaschene MACS-Säule aufgebracht, welche sich in einem starken Magnetfeld befand. Die Metallkügelchen und die an diese gebundenen Zellen wurden im Magnetfeld immobilisiert und somit in der Säule zurückgehalten. Die im Durchfluss enthaltenen, nicht-gebundenen Zellen wurden aufgefangen, die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und diese Durchflüsse ebenfalls aufgefangen. Die Zellen der aufgefangenen Zellsuspension wurden sedimentiert (10 min, 300 x g, RT), der Überstand verworfen, die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Casy, Schärfe System, Reutlingen).

3.2.4. Immunfluoreszenz

Oberflächenlokalisation von Tef1 auf *C. albicans*

Runde Deckgläschen (Ø14mm) wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet und in Mikrotiterplatten gebracht (12 Vertiefungen, flacher Boden). Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur wurden auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt (für Hefezellen in YPD, für Hypheninduktion in Zellkulturmedium ohne Gentamicin) und in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingesät. Die Zellen wurden für 3 Stunden inkubiert (Hefezellen 30 °C, Hyphen 37 °C) und adhärten so an die Deckgläschen. Die Zellen wurden zweimal mit DPBS (+1 % BSA) gewaschen und mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum inkubiert (30 min bei 37 °C sowie zusätzlich 30 min bei 4 °C). Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-rabbit-Antikörper sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (10 µg/ml) inkubiert (30 min bei 37 °C sowie zusätzlich 30 min bei 4 °C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Deckgläschen mit Hilfe eines Fluoreszenzverstärkenden Einbettmediums (Mount Fluor, Biocyc) auf Objektträgern fixiert und dieses über Nacht ausgehärtet. Anschließend wurden die Proben mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops analysiert (LSM 710, Carl Zeiss, Oberkochen).

Colokalisation von Tef1 und CR2 auf Raji-Zellen

1×10^6 Raji-Zellen wurden mit HEPES-Puffer gewaschen (2 min, 500 x g, RT) und für 30 Minuten bei 4 °C mit Tef1 (10 µg/ml) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden Fc-Rezeptoren an der Zelloberfläche mit FcR Blocking Reagent abgesättigt (10 min, RT) und anschließend mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum sowie einem mouse anti-CR2-Antikörper inkubiert (4 h, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-rabbit-Antikörper, einem Alexa Fluor®488-konjugierten anti-mouse-Antikörper sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (10 µg/ml) inkubiert (2 h, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen wurde die Zellsuspension auf Objektträgern ausgestrichen, an der Luft getrocknet und die Zel-

len mit Hilfe eines fluoreszenzverstärkenden Einbettmediums (Mount Fluor, Biocyc, Luckenwalde) unter Deckgläschen versiegelt. Die Proben wurden mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops (LSM 710, Carl Zeiss, Oberkochen) analysiert.

3.2.5. Durchflusszytometrie

Oberflächenlokalisation von Tef1 auf *C. albicans*

Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur wurden sedimentiert (10 min, 2000 x g, RT) und jeweils 1×10^6 Zellen/Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät (96 Vertiefungen, U-förmiger Boden). Die Zellen wurden mit DPBS (+Ca²⁺/Mg²⁺, +3 % BSA) gewaschen (2 x; 2 min, 2000 x g, RT) und mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum inkubiert (1 h, RT). Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-rabbit-Antikörper inkubiert (1 h, RT). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Bindung von rekombinantem Tef1 an *C. albicans*

Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur wurden sedimentiert, mit DPBS gewaschen (10 min, 2000 x g, RT) und jeweils 1×10^7 Zellen/Ansatz verwendet. Die Zellen wurden mit DPBS (+Ca²⁺/Mg²⁺, +1 % BSA) gewaschen (2x; 2 min, 16000 x g, RT) und mit dem Ligandenprotein inkubiert (1 h, 400 rpm, 37 °C). Die Zellen wurden zweimal gewaschen und mit einem mouse anti-His-Antikörper inkubiert (30 min, 4 °C). Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-mouse-Antikörper inkubiert (30 min, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Bindung von Komplementregulatoren an *C. albicans*

Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur (5×10^6 /Probe) wurden mit DPBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen (2x; 2 min, 16000 x g, RT) und mit NHS (verdünnt mit DPBS(+Ca²⁺/Mg²⁺) +1 % BSA, +10 mM EDTA) inkubiert (60 min, 37 °C, 400 rpm). Die Zellen wurden zweimal gewaschen und für 30 Minuten bei RT mit einem ligandenspezifischen Primärantikörper inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und für 30 Minuten bei RT mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Deposition von C3b auf *C. albicans*-Zellen

Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur (5×10^6 /Probe) wurden in DPBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und mit NHS (verdünnt mit DPBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) +3 % BSA) inkubiert (30 min, 400 rpm, 37 °C). Die Zellen wurden zweimal gewaschen und für eine Stunde bei RT mit einem goat anti-C3-Antiserum inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und für eine Stunde bei

RT mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-goat-Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Bindung von Tef1 an Raji-Zellen

1×10^6 Raji-Zellen wurden mit DPBS (+1 % BSA, +2 mM EDTA) zweimal gewaschen (5 min, $800 \times g$, RT). Die Zellen wurden mit Tef1 (verdünnt in DPBS +1 % BSA, +2 mM EDTA) inkubiert (30 min, 400 rpm, 37°C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum inkubiert (30 min, RT) und nach erneutem zweimaligen Waschen mit einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-rabbit-Antikörper inkubiert (30 min, RT). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Bindung von Tef1 an primäre Zellen innerhalb von PBMCs

1×10^5 Zellen/Ansatz von frisch isolierten PBMCs wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und zweimal gewaschen (DPBS + 0,1 % BSA + 0,1 % NaN_3 ; 5 min, $800 \times g$, RT). Die Zellen wurden mit fluoreszenz-gekoppeltem Ligandenprotein inkubiert (30 min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Fc-Rezeptoren der Zellen abgesättigt (FcR Blocking Reagent; 1:50 in Waschlösung; 10 min, 4°C) und die Zellen mit verschiedenen fluorophor-gekoppelten Antikörpern (1:400 final) sowie einem lebend-tot-Farbstoff (Fixable Viability Dye eFluor® 780; 1:2000 final) inkubiert (30 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen, in Waschlösung resuspendiert und durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Evaluierung von Oberflächenantigenen auf Säugerzellen

Zur Evaluierung von B-Zell-Proliferation und -Differenzierung wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubation zweimal gewaschen (DPBS + 0,1 % BSA + 0,1 % NaN_3 ; 5 min, $800 \times g$, RT). Die Fc-Rezeptoren der B-Zellen wurden blockiert (FcR-Blocking Reagent; 1:50 in Waschlösung; 10 min, 4°C) und die Zellen mit verschiedenen fluorophor-gekoppelten Antikörpern (1:400 final) sowie einem lebend-tot-Farbstoff (Fixable Viability Dye eFluor® 780; 1:2000 final) inkubiert (30 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen, in Waschlösung resuspendiert und durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

3.2.6. Funktionale Studien

Cofactorassay

Die zu untersuchenden Proteine wurden in Carbonatpuffer verdünnt in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (HiBind, Sarstedt) über Nacht bei 4°C immobilisiert. Die Platte wurde dreimal

mit PBSII + 0,05 % Tween gewaschen. Ungesättigte Bindungsstellen wurden durch eine Blocklösung (Blocking buffer I) besetzt (1 h, RT) und die Platte erneut dreimal gewaschen. Das Ligandenprotein (Faktor H bzw. CR1, jeweils 10 µg/ml in DPBS) wurde hinzugefügt, inkubiert (1 h, RT) und die Platte erneut dreimal gewaschen. Die Protease Faktor I (7,1 µg/ml) und das Substrat C3b (10 µg/ml, verdünnt in DPBS) wurden hinzugefügt und bei 37 °C inkubiert. Nach der entsprechenden Zeit wurden die Proben mit reduzierendem Probenpuffer (roti-load 1) versetzt und bei 95 °C und 400 rpm für 5 Minuten verkocht. Im Anschluss wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Abbauprodukte von C3b mittels Western Blot detektiert.

Phagozytose von *C. albicans* durch humane neutrophile Granulozyten

2 x 10⁷ Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur wurden zweimal in DPBS gewaschen (2 min, 16000 x g, RT) und mit NHS (10 %, verdünnt in DPBS) inkubiert (30 min, 400 rpm, 37 °C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit FITC (100 µg/ml in Carbonatpuffer) inkubiert (20 min, 400 rpm, 37 °C). Die Zellen wurden zweimal gewaschen, im Verhältnis 3:1 zu DiD-gefärbten humanen neutrophilen Granulozyten hinzugegeben und inkubiert (15 min, 37 °C). Die Zellen wurden mit Eis gekühlt und so die Phagozytose gestoppt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch vermessen (LSR II, BD Biosciences, Heidelberg).

Schädigung von HUVECs durch an die Oberfläche von *C. albicans* gebundenes Plasmin

2 x 10⁷ Zellen einer *C. albicans*-Übernachtskultur wurden zweimal in DPBS gewaschen (2 min, 16000 x g, RT) und mit Plasminogen (200 µg/ml, verdünnt in DPBS) inkubiert (60 min, 400 rpm, 37 °C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in HUVEC-Zellkulturmedium verdünnt (2 x 10⁷ Zellen/ml) und 50 µl/Vertiefung zu konfluent gewachsenen HUVECs gegeben (Mikrotiterplatte, 96 Vertiefungen, flacher Boden, s.o.). Den Proben wurden tPA (100 µg/ml) und Aprotinin (500 µg/ml) hinzugefügt und die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen zweimal mit warmen DPBS gewaschen, 100 µl/Vertiefung CellTiter-Blue®-Substrat hinzugefügt und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Umsatz des im Substrat enthaltenen Resazurins zu Resorufin ist proportional zur Menge der lebenden HUVECs. Die Menge des gebildeten Resorufins wurde photometrisch bei 570 nm quantifiziert.

Raji-Zell-Aktivierungsassay

Raji-Zellen (3 x 10⁶ Zellen/Ansatz) wurden in 80 µl DPBS (+2 mM EDTA) aufgenommen und mit 20 µl Stimulus für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (2 min, 800 x g, 4 °C), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 75 µl eiskaltem Lysepuffer aufgenommen und inkubiert (5 min, 4 °C). Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (20 sec, 4 °C) und zentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt (roti-load 1) und bei 95 °C und 400 rpm für 5 Minuten verkocht. Im Anschluss wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot wurde die

phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form der B-Zell-Aktivierungsmarker CD19 und Akt detektiert.

Produktion von Zytokinen/IgG durch PBMCs und B-Zellen

PBMCs oder gereinigte B-Zellen wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Zellkulturmedium verdünnt und in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, flacher Boden, Thermo) ausgesät. Die Zellen wurden mit anti-CD3 oder anti-IgA/G/M ($5 \mu\text{g/ml}$) + anti-CD40 ($1 \mu\text{g/ml}$; R&D) sowie Tef1 versetzt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen sedimentiert und verworfen. Die Zytokin- bzw. IgG-Konzentration in den Kulturüberständen wurde nach Herstellerangaben mittels ELISA bestimmt (Kits BD555157, BD555142, BD555212, BioLegend 431801). Hierzu wurden anti-Zytokin- bzw. anti-IgA/G/M-Antikörper in Carbonatpuffer verdünnt und über Nacht in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBSII +0,05 % Tween wurden ungesättigte Bindungsstellen mit Assaypuffer (DPBS + 10 % FCS) besetzt (1 h, RT) und die Platten erneut dreimal gewaschen. Die Zellkulturüberstände wurden 1:5 in Assaypuffer verdünnt und eine Stunde in den Mikrotiterplatten belassen. Nach fünfmaligem Waschen wurde ein biotinylierter anti-Zytokin-Antikörper sowie Streptavidin-gekoppelte HRP (verdünnt in Assaypuffer) hinzugefügt und für 1 h bei RT inkubiert. Für die Bestimmung von IgG wurde ein HRP-konjugiertes anti-IgG-Antiserum verwendet. Nach siebenmaligem Waschen wurden die Proben mit TMB-Substratlösung versetzt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,25 M Schwefelsäure gestoppt und das entstandene Produkt durch Messung der Absorbanz bei 450 nm quantifiziert (Tecan safire², Tecan Group, Männedorf, Schweiz).

B-Zell-Proliferationsassay

B-Zellen wurden in Zellkulturmedium (ohne FCS) auf 1×10^7 Zellen/ml verdünnt. 1 ml der Zellsuspension wurde mit CellTrace™ Violet (Life Technologies) versetzt ($1 \mu\text{M}$ Endkonzentration) und für 10 min bei 37°C inkubiert. Der Suspension wurden 14 ml Zellkulturmedium (mit FCS) hinzugefügt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Zellkulturmedium (mit FCS) gewaschen und auf 5×10^5 Zellen/ml verdünnt. 1×10^5 Zellen/Vertiefung wurden in einer Mikrotiterplatte ausgesät (48 Vertiefungen) und mit anti-IgA/G/M ($12,5 \mu\text{g/ml}$) und anti-CD40 ($1 \mu\text{g/ml}$; R&D) sowie anti-CD35 oder Tef1 ($10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und anschließend auf den Zellen Oberflächenantigene mittels fluorophor-gekoppelter Antikörper angefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch vermessen.

B-Zell-Differenzierungsassay

PBMCs wurden in Zellkulturmedium verdünnt und 4×10^5 Zellen in 200 μl /Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät (96 Vertiefungen, U-förmiger Boden). Die Zellen wurden mit PWM

(40 ng/ml) sowie Tef1 stimuliert und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Erneuerung des Mediums und der Stimuli wurden die Zellen erneut für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert und die Kulturüberstände zur Zytokinbestimmung verwendet (s.o.). Auf den Zellen wurden Oberflächenantigene mittels fluorophor-gekoppelter Antikörper angefärbt und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

Gereinigte primäre humane B-Zellen wurden in Zellkulturmedium verdünnt und 2×10^5 Zellen in 100 µl/Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät (96 Vertiefungen, U-förmiger Boden). Die Zellen wurden mit anti-IgA/G/M (5 µg/ml), anti-CD40 (1 µg/ml; R&D), IL-2 (50 ng/ml) und IL-10 (50 ng/ml) sowie Tef1 stimuliert und für 96 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Erneuerung des Mediums und der Stimuli (nur IL-2 und IL-10 sowie Tef1) wurden die Zellen erneut für 96 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert und die Kulturüberstände zur Zytokinbestimmung verwendet (s.o.). Auf den Zellen wurden Oberflächenantigene mittels fluorophor-gekoppelter Antikörper angefärbt und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

T-Zell-Proliferationsassay

T-Zellen wurden in Zellkulturmedium (ohne FCS) auf 1×10^7 Zellen/ml verdünnt. 1 ml der Zellsuspension wurde mit CellTrace™ Violet (Life Technologies) versetzt (1 µM Endkonzentration) und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der Suspension wurden 14 ml Zellkulturmedium (mit FCS) hinzugefügt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Zellkulturmedium (mit FCS) gewaschen. Anti-CD3 (10 µg/ml), anti-CD28 (10 µg/ml) sowie anti-IgA/G/M (5 µg/ml, verdünnt in DPBS) wurden in Mikrotiterplatten immobilisiert (48 Vertiefungen, flacher Boden). Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden T-Zellen und B-Zellen (jeweils 8×10^4 Zellen/Vertiefung) in insgesamt 200 µl Zellkulturmedium in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ausgesät. Zusätzlich wurden die Zellen mit Tef1 versetzt (10 µg/ml). Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, anschließend sedimentiert und 100 µl des Überstandes verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden auf den Zellen Oberflächenantigene mittels fluorophor-gekoppelter Antikörper angefärbt und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

3.2.7. Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit Prism® 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

4. Ergebnisse

4.1. Faktor H bindet an Tef1 und Tef1-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität

Vorexperimente in unserer Arbeitsgruppe identifizierten mittels eines Proteom-Ansatzes Liganden für den Komplementregulator Faktor H in Zelllysaten von *Candida albicans*. Eines der gefundenen Proteine war der Translations-Elongationsfaktor 1 (*translation elongation factor 1*, Tef1). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse bestätigt und die Interaktion von Tef1 mit Faktor H näher charakterisiert.

Rekombinant hergestelltes Tef1-Protein wurde in Mikrotiterplatten immobilisiert und mit inaktivierten NHS inkubiert. An Tef1 gebundene Proteine wurden eluiert und mittels Western Blot nachgewiesen. Ein Faktor-H-Antiserum identifizierte das Faktor H-Protein bei 150 kDa (Abbildung 4.1A). Die Bindung von Faktor H an Tef1 wurde mittels *Biolayer-Interferometry* (BLItz) näher charakterisiert. Rekombinantes Tef1 wurde über seinen His-tag an die Nickel-Matrix von Biosensoren gebunden und mit gereinigtem Faktor H als Analyten inkubiert. Die Messung der Assoziation von Faktor H an Tef1 bei verschiedenen Konzentrationen sowie der anschließenden Dissoziation erlaubte die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D und somit die Quantifizierung der Bindungsstärke. Für die Interaktion von Tef1 mit Faktor H ergab sich $K_D=183$ nM (Abbildung 4.1B). Es stellte sich die Frage, ob Tef1-gebundener Faktor H aktiv ist. Um dies zu testen, wurde Tef1 in Mikrotiterplatten immobilisiert, gereinigter Faktor H an Tef1 gebunden und die Protease Faktor I sowie das Substrat C3b hinzugegeben. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und C3b und seine Abbauprodukte im Western Blot detektiert. In Gegenwart von Faktor I vermittelte Tef1-gebundener Faktor H die Spaltung von C3b; es entstanden die Abbauprodukte $\alpha'68$, $\alpha'43$ und $\alpha'41$ (Abbildung 4.1C).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der zentrale Komplementregulator Faktor H an Tef1 bindet und dabei seine Cofaktoraktivität für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b beibehält.

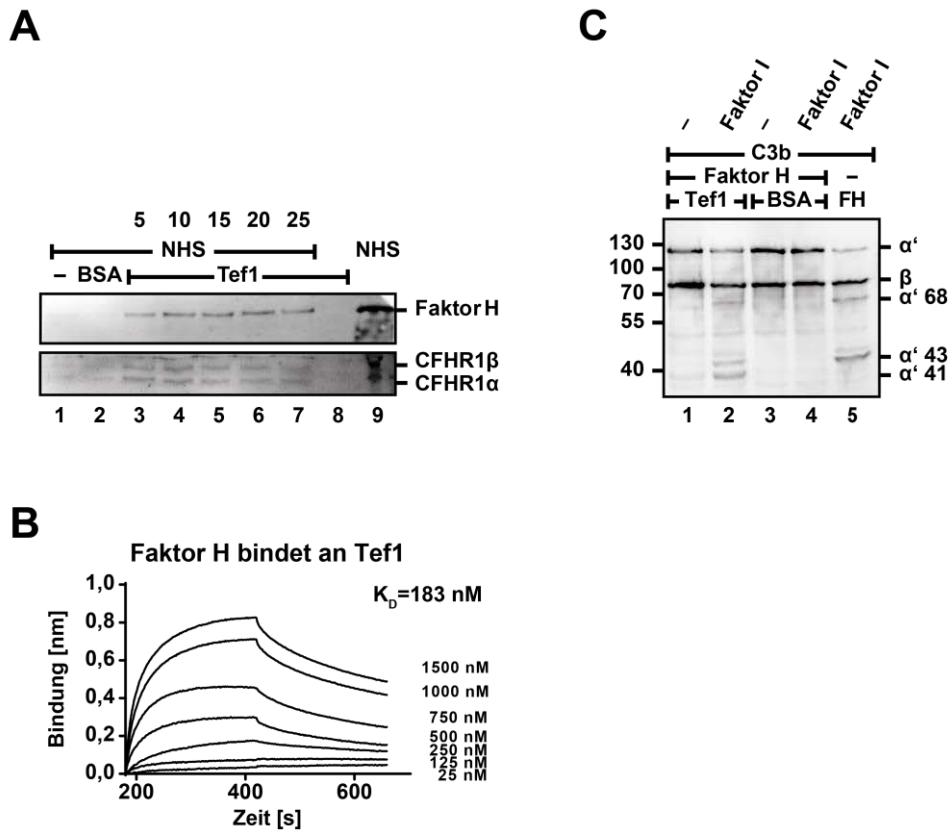


Abbildung 4.1: Faktor H bindet an Tef1 und Tef1-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität

(A) Western Blot eines CEWA. Immobilisiertes Tef1 wurde mit iNHS (NHS + 10 mM EDTA) inkubiert und gebundener Faktor H wurde im Western Blot mittels eines goat anti-Faktor H-Antiserums (1:1000) detektiert. Das Antiserum detektierte ebenfalls CFHR1 α und CFHR1 β . Faktor H und CFHR1 banden spezifisch an Tef1, die Bindung war dosisabhängig (Spuren 3-7). Die Proteine banden nicht an BSA (Spur 2) oder die Oberfläche der Mikrotiterplatten (Spur 1). **(B)** Assoziation und Dissoziation von Faktor H an Tef1, *Biolayer Interferometry* (BLItz). Faktor H assoziierte an immobilisiertes Tef1 und dissoziierte von diesem. Der Effekt war dosisabhängig. Die resultierende Dissoziationskonstante K_D betrug 183 nmol/l. **(C)** Western Blot eines Cofaktorassays. Faktor H band an immobilisiertes Tef1 und wurde anschließend mit C3b und Faktor I coinkubiert. C3b und dessen Abbauprodukte wurden mittels eines goat anti-C3-Antiserums (1:1000) detektiert. Tef1-gebundener Faktor H katalysierte die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b (Spur 2). In Abwesenheit von Faktor I fand keine Spaltung von C3b statt (Spuren 1 und 3). Faktor H band nicht an BSA und es fand keine Spaltung von C3b statt (Spur 4). Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.2. Die Komplementregulatoren FHL-1, CFHR1, C4BP und Properdin binden an Tef1

Mehrere Proteine von *C. albicans* binden Faktor H (Gpm1 [194], Gpd2 [198], Pra1 [195] und Hgt1p [199]) aber auch weitere Komplementregulatoren wie das *Factor H-like protein 1* (FHL-1), *complement factor H related protein 1* (CFHR1), *C4 binding protein* (C4BP) sowie das die C3-Konvertase stabilisierende Protein *Properdin* (Faktor P) (unpublizierte Beobachtungen).

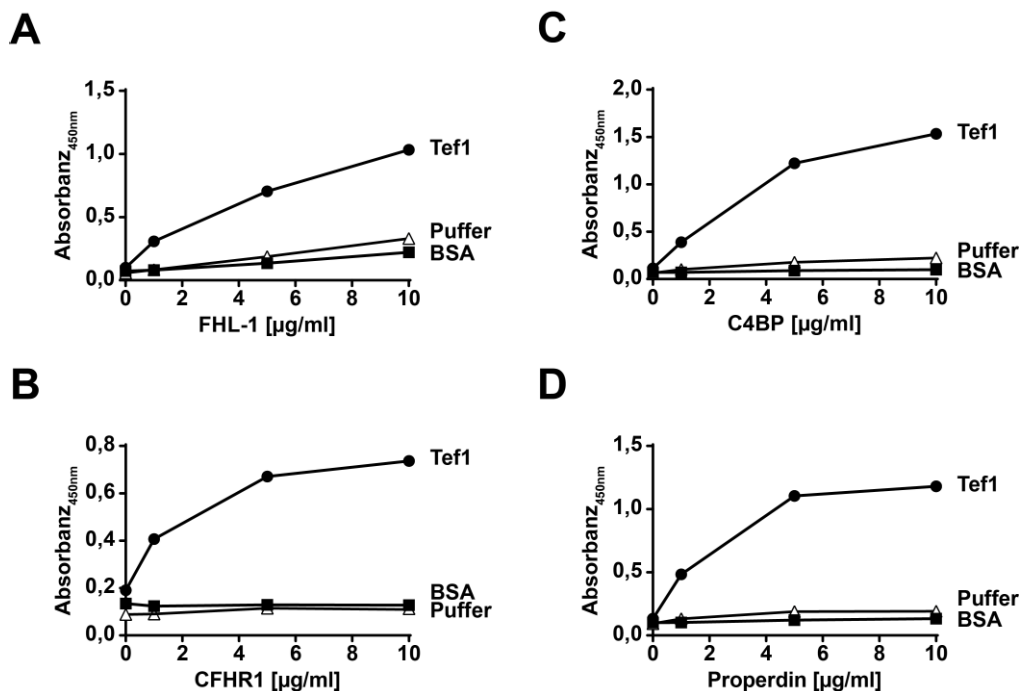


Abbildung 4.2: Komplementregulatoren binden an Tef1

(A-D) Bindung von Komplementregulatoren an Tef1 im ELISA. Immobilisiertes Tef1 wurde mit FHL-1 (A), C4BP (B), CFHR1 (C) oder Properdin (D) inkubiert und gebundene Proteine mit einem goat anti-Faktor H-Antiserum (1:1000, A+C), sheep anti-C4BP-Antiserum (1:1000, B) oder goat anti-Properdin-Antiserum (1:1000, D) detektiert. Alle Komplementregulatoren banden an Tef1 und die Bindung war dosisabhängig. Keines der Proteine band an BSA oder die Oberfläche der Mikrotiterplatten. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Zur weiteren Charakterisierung von Tef1 wurde die Interaktion von Tef1 mit den o.g. Komplementregulatoren untersucht. Rekombinantes Tef1 wurde in Mikrotiterplatten immobilisiert und jeweils mit den o.g. Proteinen inkubiert. Die Komplementregulatoren FHL-1, C4BP, CFHR1 und Properdin banden an Tef1; die Bindung war jeweils dosisabhängig (Abbildung 4.2A-D). Die Bindung von CFHR1 an Tef1 wurde in einem CEWA-Experiment bestätigt (Abbildung 4.1A). Hierbei wurde die Bindung von CFHR1 aus iNHS an Tef1 gezeigt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Tef1 Faktor H und die Komplementregulatoren FHL-1, CFHR1, C4BP und Properdin bindet und daher mannigfaltig zur Komplementevasion von *C. albicans* beitragen kann.

4.3. Tef1 wird auf der Zelloberfläche von *C. albicans* exprimiert

Als Bestandteil der eukaryotischen Proteinbiosynthese wurde Tef1 als zytoplasmatisches Protein beschrieben und seine Rolle in der Translation charakterisiert [242]. Hierbei ist das Protein essentiell; werden die beiden für das Tef1-Protein codierenden Gene *TEF1* und *TEF2* ausgeknockt, sind die Zellen nicht lebensfähig [245]. Der in dieser Arbeit verwendete homozygote Knockout-Stamm *tef1Δ/Δ* enthält beide Allele des *TEF2*-Gens und das von *TEF2* codierte Tef1-Protein stellt das Überleben der Zellen des Knockout-Stammes sicher [248].

Der Knockout des *TEF1*-Gens führt zu einer deutlichen Reduktion des in Lysaten von Hefezellen vorhandenen Tef1-Proteins (Abbildung 4.3A). Um eine Rolle für die Komplementevasion von *C. albicans* zu spielen, muss Tef1 mit löslichen Komplementproteinen interagieren und dementsprechend in Kontakt zum extrazellulären Raum stehen. Daher wurde untersucht, ob Tef1 auch an der Oberfläche von *C. albicans* exprimiert wird. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von Tef1 an der Oberfläche von Hefezellen von *C. albicans* quantifiziert. Tef1 wurde auf *C. albicans*-Zellen exprimiert und die Expression war auf Zellen des Knockout-Stammes *tef1Δ/Δ* um ca. 50 % reduziert (Abbildung 4.3B). Diese Ergebnisse wurden durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt. Auf Hefezellen zeigten sich oberflächenspezifische Fluoreszenzsignale. Die Signalintensität von Zellen des Knockout-Stammes *tef1Δ/Δ* war geringer als von Zellen des Wildtyp-Stammes BWP17 und der Revertante *tef1Δ/Δ::TEF1*. Weiterhin zeigten sich stärkere Fluoreszenzsignale auf der Oberfläche von Hyphen als von Hefezellen (Abbildung 4.3C).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 einerseits ein zytoplasmatisches Protein ist, es aber darüber hinaus auf der Oberfläche von Candidazellen exprimiert wird. Somit steht Tef1 in Kontakt mit löslichen Komplementregulatoren und könnte diese an die Zelloberfläche rekrutieren.

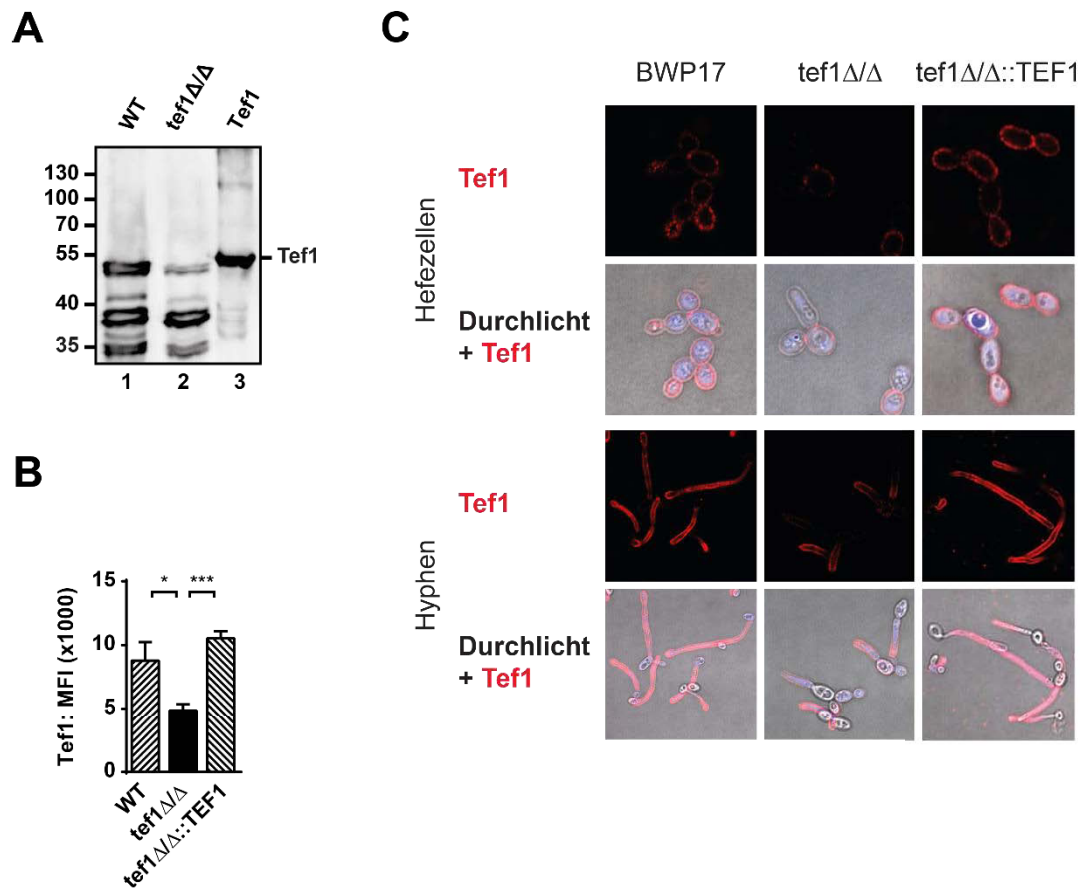


Abbildung 4.3: Tef1 wird auf der Zelloberfläche von *C. albicans* exprimiert

(A) Western Blot von *C. albicans*-Zelllysaten. Tef1 wurde mittels eines rabbit anti-Tef1-Antiserums (1:1000) detektiert. Im Lysat von *tef1*Δ/Δ-Zellen war deutlich weniger Tef1 enthalten als im Lysat von Wildtypzellen. **(B)** Durchflusszytometrische Quantifizierung der Oberflächenexpression von Tef1. *C. albicans*-Hefezellen wurden mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum (1:100) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-rabbit-Antikörper (1:400) inkubiert. Auf der Oberfläche von *tef1*Δ/Δ-Zellen war signifikant weniger Tef1 exprimiert als auf Zellen des Wildtyps oder der Revertante *tef1*Δ/Δ::TEF1. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. albicans*. Hyphen und Hefezellen wurden mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum (1:40) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-rabbit-Antikörper (1:80) inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Tef1 (rot) wurde an der Oberfläche von *C. albicans* exprimiert. Insgesamt war die Expression von Tef1 stärker auf Hyphen (unten) als auf Hefezellen (oben). Hierbei war die Expression auf *tef1*Δ/Δ-Zellen (Mitte) geringer als auf Zellen des Wildtyps (links) und der Revertante (rechts). Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.4. Tef1 wird sezerniert und bindet an die Zelloberfläche von *C. albicans*

Neben der Oberflächenlokalisierung stellt auch die Sezernierung von Tef1 eine Möglichkeit dar, das Protein für die Interaktion mit löslichen Komplementregulatoren verfügbar zu machen. Es stellte sich die Frage, ob Tef1 sezerniert wird.

Im Kulturüberstand von Zellen des Wildtyps BWP17 war Tef1 vorhanden, im Überstand von Zellen des Knockout-Stammes *tef1* Δ/Δ hingegen nicht (Abbildung 4.4A). Die Sezernierung von Tef1 stellt eine Möglichkeit dar, wie Tef1 an die Oberfläche von *C. albicans* transportiert werden kann. Bislang ist kein Mechanismus beschrieben, der den Einbau von Tef1 in die Zellmembran bzw. die Zellwand von *C. albicans* beschreibt. Es wurde untersucht, ob lösliches Tef1 an die Zelloberfläche von *C. albicans* bindet. Hierzu wurden Candidazellen mit rekombinantem Tef1 inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 durchflusszytometrisch detektiert. Tef1 band an Candidazellen (Abbildung 4.4B).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass Tef1 von Candidazellen sezerniert wird und lösliches Tef1 wiederum an die Pilzzellen bindet. Dies stellt eine Erklärung für die Oberflächenlokalisierung von Tef1 dar und ermöglicht ferner, dass Tef1 auch fernab der Candidazellen agiert.

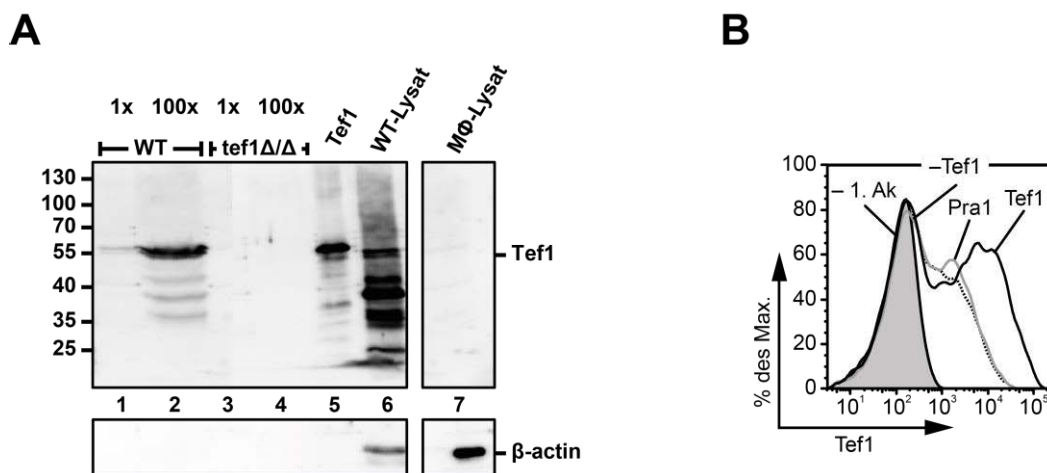


Abbildung 4.4: Tef1 wird sezerniert und bindet an die Zelloberfläche von *C. albicans*

(A) Western Blot von Kulturüberständen von *C. albicans*. Tef1 wurde mittels eines rabbit anti-Tef1-Antiserums (1:1000), β -actin mittels eines rabbit anti- β -actin-Antiserums (1:1000) detektiert. Wildtypzellen sezernierten Tef1 in den Kulturüberstand (Spuren 1-2), *tef1* Δ/Δ -Zellen nicht (Spuren 3-4). β -actin fungiert als Indikator für Zelllyse und ist in Kulturüberständen nicht vorhanden (Spuren 1-4). (B) Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung von Tef1 an *C. albicans* BWP17. Hefezellen wurden mit rekombinantem Tef1 inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 wurde mit einem mouse anti-His-Antikörper (1:200) sowie einem Alexa Fluor®488-konjugierten goat anti-mouse-Antikörper (1:400) detektiert. Tef1 band an die Oberfläche von *C. albicans*. Pra1 fungierte als Positivkontrolle. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.5. Tef1 rekrutiert die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen an die Zelloberfläche von *C. albicans*

Wenn *C. albicans* im menschlichen Organismus die Blutbahn erreicht, rekrutiert der Hefepilz Komplementregulatoren und schützt sich so vor Attacken des Komplementsystems. Als Oberflächenprotein von *C. albicans* steht Tef1 im Kontakt mit löslichen Komplementregulatoren wie Faktor H, Plasminogen und C4BP. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese humanen Regulatoren *in vitro* an rekombinantes Tef1 binden. Im Folgenden wurde untersucht, ob Tef1 diese Proteine an die Oberfläche von *C. albicans* rekrutiert.

Faktor H, Plasminogen und C4BP banden an Candidazellen (Abbildung 4.5A-C). Die Bindung von Faktor H an den Knockout-Stamm *tef1Δ/Δ* war reduziert (68 % der Menge des Wildtyps) und der Unterschied war signifikant, während die Bindung an die Revertante *tef1Δ/Δ::TEF1* annähernd jener des Wildtyps entsprach (116 %) (Abbildung 4.5A). Die Bindung von Plasminogen an den Knockout-Stamm *tef1Δ/Δ* war stark reduziert (20 % der Menge des Wildtyps) und der Unterschied war signifikant, während die Bindung an die Revertante *tef1Δ/Δ::TEF1* annähernd jener des Wildtyps entsprach (95 %) (Abbildung 4.5B). Die Bindung von C4BP an den Knockout-Stamm *tef1Δ/Δ* unterschied sich nicht vom Wildtypen (102 % der Menge des Wildtyps) oder der Revertante *tef1Δ/Δ::TEF1* (188 %) (Abbildung 4.5C). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigten, dass Faktor H auf der Oberfläche von *C. albicans* an Tef1 band. Einerseits zeigte sich die Oberflächenlokalisierung von Tef1 (Abbildung 4.5D, oben links), weiterhin war die Rekrutierung von Faktor H an die Zelloberfläche sichtbar (Abbildung 4.5D, oben rechts). In der Überlagerung der Fluoreszenzsignale zeigte sich, dass Faktor H mit Tef1 colokalisierte (Abbildung 4.5D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Tef1 die Bindung von Faktor H und Plasminogen an *C. albicans* vermittelt. Somit ist Tef1 ein CRASP (*complement regulator acquiring surface protein*) von *C. albicans*.

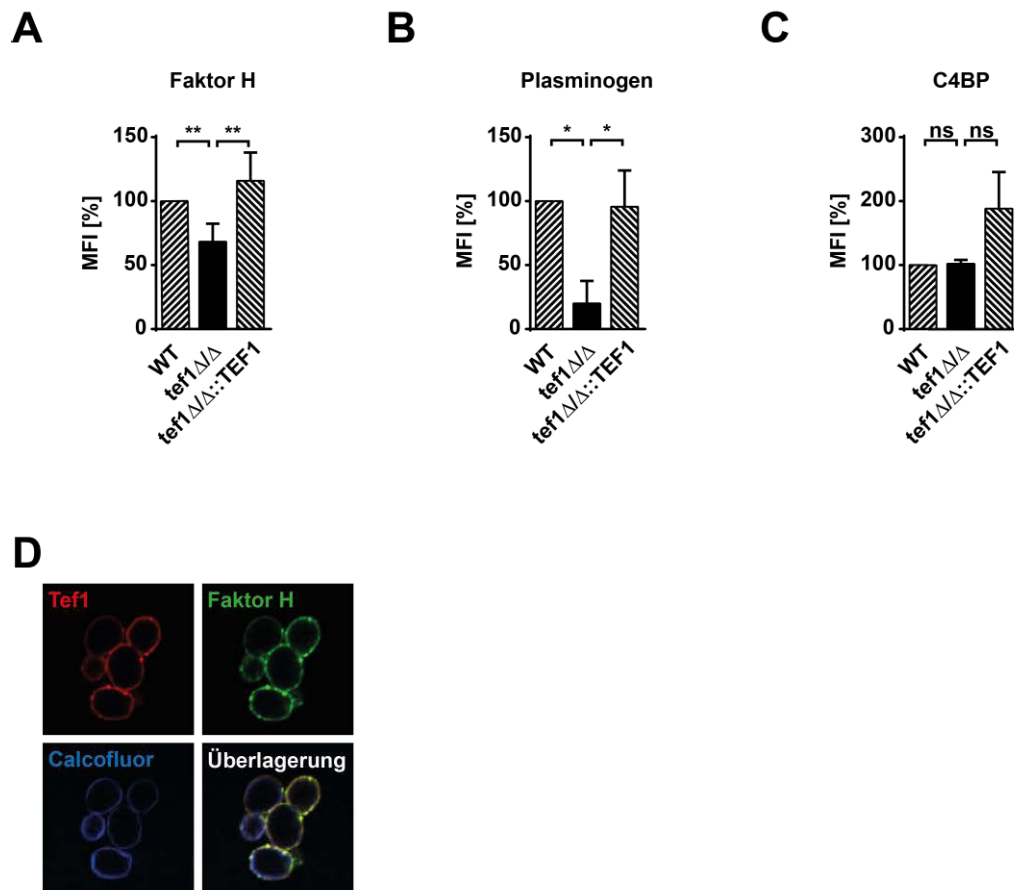


Abbildung 4.5: Tef1 vermittelt die Bindung von Komplementregulatoren an *C. albicans*

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung von Faktor H (A), Plasminogen (B) und C4BP (C) an *C. albicans*. Hefezellen wurden mit iNHS inkubiert (10 % NHS + 10 mM EDTA). Faktor H wurde mit einem mouse anti-Faktor H-Antikörper (C18, 1:100) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten anti-mouse-Antikörper (1:400), Plasminogen mit einem goat anti-Plasminogen-Antiserum (1:200) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten rabbit anti-goat-Antikörper (1:400), C4BP mit einem sheep anti-C4BP-Antiserum (1:200) sowie einem Alexa Fluor®488-konjugierten donkey anti-goat-Antikörper (1:400) detektiert. Die Komplementregulatoren banden an die Oberfläche von *C. albicans*. Faktor H und Plasminogen banden mit geringerer Intensität an *tef1* $\Delta\Delta$ -Zellen als an Zellen des Wildtyps oder der Revertante. C4BP band nicht stärker an Zellen eines bestimmten Genotyps. (D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *C. albicans*-Hefezellen. Hefezellen wurden mit iNHS inkubiert (10 % NHS + 10 mM EDTA). Oberflächengebundener Faktor H wurde mit einem goat anti-Faktor H-Antiserum (1:100) sowie einem Alexa Fluor®488-konjugierten rabbit anti-goat-Antikörper (1:200), Tef1 wurde mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum (1:40) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-rabbit-Antikörper (1:80) angefärbt. Die Zellwand wurde mit Calcofluor-white angefärbt (blau). An der Zelloberfläche colokalisierten Tef1 (rot) und Faktor H (grün). Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.6. An die Oberfläche von *C. albicans* rekrutiertes Plasmin schädigt Endothelzellen

Tef1 vermittelt die Rekrutierung des Komplementregulators Plasminogen an die Oberfläche von *C. albicans*. Plasminogen wird durch proteolytische Spaltung zur Protease Plasmin aktiviert. Es wurde gezeigt, dass *C. albicans* durch Proteasen Epithel- und Endothelbarrieren schädigt und sich so im Wirtsorganismus ausbreitet [187, 188]. Es stellte sich die Frage, ob an die Oberfläche gebundenes Plasminogen zur Gewebsinvasion von *C. albicans* beiträgt.

Plasminogen wurde an die Zelloberfläche von *C. albicans* gebunden und die Candidazellen mit HUVECs coinkubiert (*human umbilical vein endothelial cells*). Candidazellen allein schädigten HUVECs nicht. Auch mit Plasminogen beladene Candidazellen beeinträchtigten die Lebensfähigkeit von HUVECs nicht. Wurde an Candidazellen gebundenes Plasminogen zu Plasmin aktiviert, wurden HUVECs geschädigt. Der Effekt war signifikant. Die Inhibition von Plasmin durch Aprotinin hob den zellschädigenden Effekt wieder auf (Abbildung 4.6).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass an die Oberfläche von *C. albicans* gebundenes Plasminogen zu Plasmin aktiviert wird und Plasmin Endothelzellen schädigt. Damit kann oberflächengebundenes Plasmin zur Gewebsinvasion von *C. albicans* beitragen.

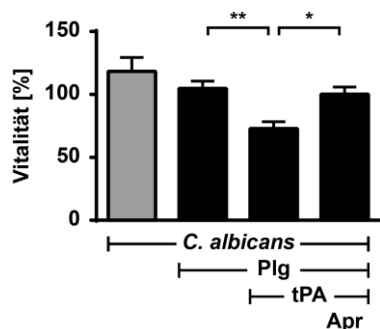


Abbildung 4.6: An die Oberfläche von *C. albicans* rekrutiertes Plasmin schädigt Endothelzellen

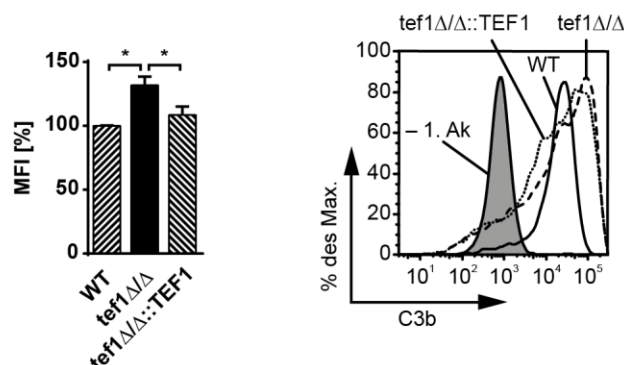
Vitalität von Endothelzellen in Cokultur mit *C. albicans*. HUVECs wurden mit Candidazellen coinkubiert (24 h, 37 °C) und die Vitalität der Endothelzellen anhand des Umsatzes von Resazurin zu Resorufin bestimmt. Die Vitalität ist in Relation zu HUVEC-Monokulturen angegeben. In HUVEC-Candida-Cokulturen war die Vitalität nicht verändert. Oberflächengebundenes Plasminogen veränderte die Vitalität nicht. Wurde Plasminogen durch tPA zu Plasmin aktiviert, wurden Endothelzellen geschädigt. Der Effekt war signifikant. Wurde Plasmin durch Aprotinin gehemmt, wurde der zellschädigende Effekt aufgehoben. Der Effekt von Aprotinin war signifikant.

4.7. Tef1-gebundene Komplementregulatoren inhibieren die komplement-abhängige Deposition von C3b und die Phagozytose durch humane neutrophile Granulozyten

An die Oberfläche von *C. albicans* rekrutierte Komplementregulatoren vermindern die Opsonisierung, die Schädigung und die Phagozytose der Zellen durch humane Immunzellen [196, 199]. *C. albicans* exprimiert zum Zweck der Rekrutierung von Komplementregulatoren spezifische Moleküle an der Zelloberfläche (CRASPs). Die bisherigen Ergebnisse identifizierten Tef1 als ein CRASP. Es stellte sich die Frage, ob die Tef1-vermittelte Rekrutierung von Komplementregulatoren die Widerstandsfähigkeit von *C. albicans* dem Komplementsystem gegenüber erhöht.

Candidazellen wurden mit aktiven NHS inkubiert und die Deposition von C3b auf die Zelloberfläche (Opsonisierung) durchflusszytometrisch quantifiziert. Zellen des Knockout-Stammes *tef1* Δ/Δ wurden 31 % stärker opsonisiert als Zellen des Wildtyp-Stammes, während die Opsonisierung der Revertante *tef1* $\Delta/\Delta::TEF1$ 108 % der des Wildtyps betrug (Abbildung 4.7A).

A



B

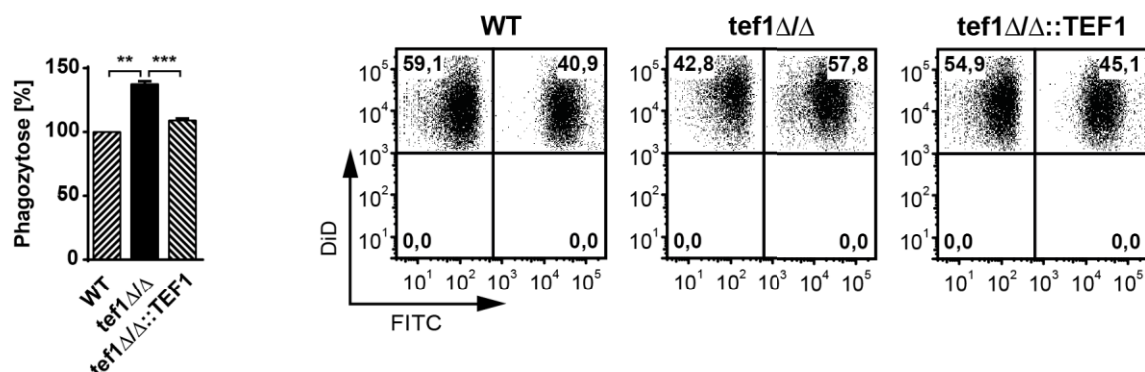


Abbildung 4.7: Tef1 vermittelt Resistenz gegen Komplement-vermittelte Opsonisierung und Phagozytose

(A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der C3b-Deposition. *C. albicans*-Hefezellen wurden mit NHS inkubiert und an die Oberfläche gebundenes C3b wurde mit einem mouse anti-C3d-Antikörper (1:200) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-mouse-Antikörper (1:400) detektiert. Auf der Oberfläche von *tef1Δ/Δ*-Zellen war signifikant mehr C3b gebunden als auf Zellen des Wildtyps und der Revertante *tef1Δ/Δ::TEF1*. **(B)** Durchflusszytometrische Quantifizierung der Phagozytose von *C. albicans* durch humane neutrophile Granulozyten. Mit FITC markierte *C. albicans*-Hefezellen wurden mit NHS inkubiert und anschließend mit DiD-gefärbten neutrophilen Granulozyten coinkubiert. Der Anteil der DiD⁺/FITC⁺ Granulozyten an allen Granulozyten diente als Indikator für die Phagozytose. Nach fünfminütiger Coinkubation wurden *tef1Δ/Δ*-Zellen im Vergleich zu Zellen des Wildtyps und der Revertante vermehrt phagozytiert. Die Unterschiede waren signifikant. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Tef1-vermittelte Rekrutierung von Komplementregulatoren und die daraus folgende verminderte Opsonisierung einen Einfluss auf die Phagozytose von Candidazellen durch human neutrophile Granulozyten haben. Hierzu wurden Candidazellen mit aktiven NHS inkubiert – und somit opsonisiert – und im Anschluss mit primären neutrophilen Granulozyten coinkubiert. Hefezellen des Knockout-Stammes *tef1Δ/Δ* wurden 38 % stärker phagozytiert als Zellen des Wildtyp-Stammes, während die Phagozytose von Hefezellen der Revertante *tef1Δ/Δ::TEF1* 109 % der des Wildtyps betrug (Abbildung 4.7B).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass in Gegenwart von Tef1 die Opsonisierung und zudem die Phagozytose von opsonisierten Hefezellen inhibiert werden und Tef1 somit zur Komplement- und Immunevasion von *C. albicans* beiträgt.

4.8. Tef1 bindet die Komplementproteine C3dg und C3d, nicht aber C3b

Zur Charakterisierung der Wechselwirkungen von Tef1 mit dem humanen Komplementsystem wurden neben der Bindung von Komplementregulatoren an Tef1 auch die Interaktionen von Tef1 mit Proteinen der Komplementkaskade untersucht. Das Komplementprotein C3b band nicht an Tef1 (Abbildung 4.8A), jedoch banden dessen Abbauprodukte C3dg und C3d an Tef1. Die Bindung war dosisabhängig. (Abbildung 4.8B+C). Die Bindung von C3d an Tef1 wurde mittels *Biolayer-Interferometry* (BLItz) näher untersucht. Die Messung der Assoziation von C3d an Tef1 bei verschiedenen Konzentrationen sowie die anschließende Dissoziation von C3d erlaubte die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D und somit die Quantifizierung der Bindungsstärke. Für die Interaktion von Tef1 und C3d ergab sich $K_D=292$ nM (Abbildung 4.8D). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 spezifisch die C3-Fragmente C3dg und C3d, nicht jedoch das Opsonin C3b bindet.

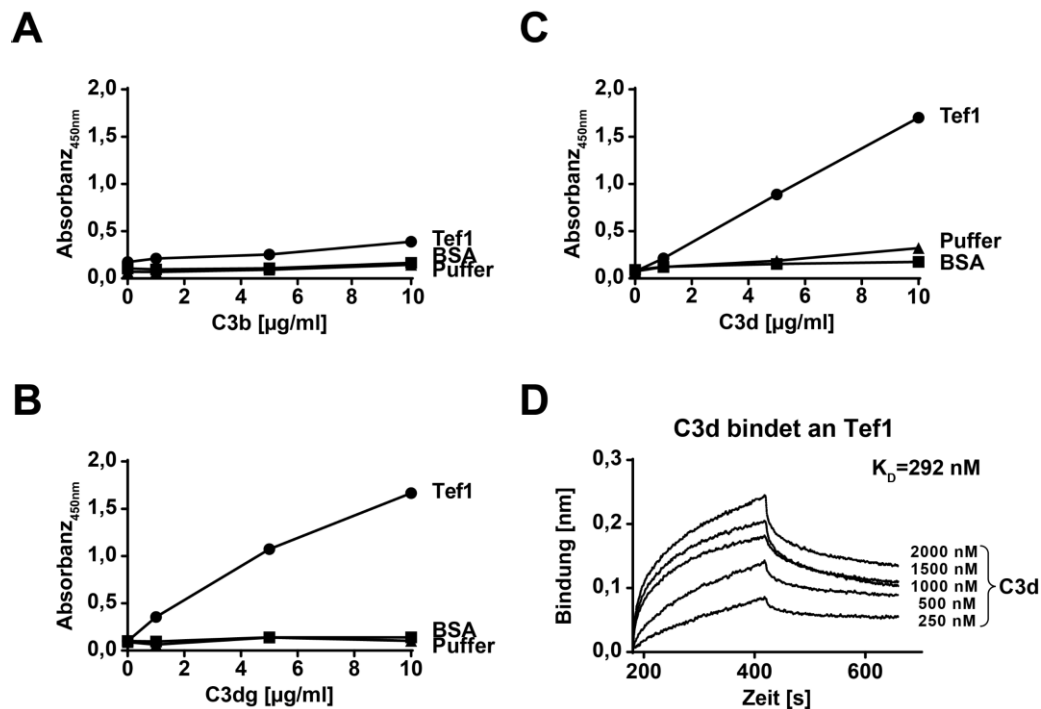


Abbildung 4.8: Tef1 bindet nicht an C3b, jedoch an dessen Abbauprodukte C3dg und C3d

(A-C) Bindung von Komplementproteinen an Tef1 im ELISA. C3b (A), C3dg (B) oder C3d (C) wurden mit immobilisiertem Tef1 inkubiert und gebundene Proteine mit einem mouse anti-C3b-Antikörper (1:1000) oder einem mouse anti-C3d-Antikörper (1:1000) detektiert. C3dg und C3d, nicht jedoch C3b, banden an Tef1. Keines der Proteine band an BSA oder die Oberfläche der Mikrotiterplatte. (D) Assoziation und Dissoziation von C3d an Tef1, *Biolayer Interferometry* (BLITZ). C3d zeigte ein dosisabhängiges Assoziations- und Dissoziationsverhalten an immobilisiertes Tef1. Die resultierende Dissoziationskonstante K_D betrug 292 nmol/l. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.9. Tef1 hat keinen Einfluss auf die Bindung von CR2 an C3d

Das C3-Abbauprodukt C3d bindet an den Komplementrezeptor 2 (CR2, CD21), welcher hauptsächlich auf B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen (FDCs) exprimiert wird, und spielt dabei eine wichtige Rolle in der Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Es ist bekannt, dass Mikroorganismen diese Interaktion stören und somit das Einsetzen der adaptiven Immunantwort behindern. Das Protein EfbC von *Staphylococcus aureus* bindet an C3d und blockiert auf diese Weise die Bindung von C3d an CR2 [162].

Es wurde untersucht, ob Tef1 die Bindung von C3d an CR2 inhibiert. CR2 wurde in Mikrotiterplatten immobilisiert und in Gegenwart von Tef1 oder EfbC mit C3d inkubiert. Tef1 beeinflusste die Bindung von C3d an CR2 nicht, während EfbC von *S. aureus* die Bindung inhibierte (Abbildung 4.9A). Diese Ergebnisse wurden durch Immunpräzipitation bestätigt. C3d wurde mit-

tels eines spezifischen Antikörpers präzipitiert (Abbildung 4.9B, Spur 1). Tef1 oder CR2 wurden mit C3d copräzipitiert (Spur 2+3). Die Copräzipitation von CR2 wurde durch EfbC (Spur 4), nicht jedoch durch Tef1 (Spuren 5-7) blockiert.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Bindung von Tef1 an C3d die Interaktion von C3d mit dem Komplementrezeptor 2 (CR2, CD21) nicht beeinflusst. Vielmehr können sowohl Tef1 als auch CR2 zeitgleich an C3d binden.

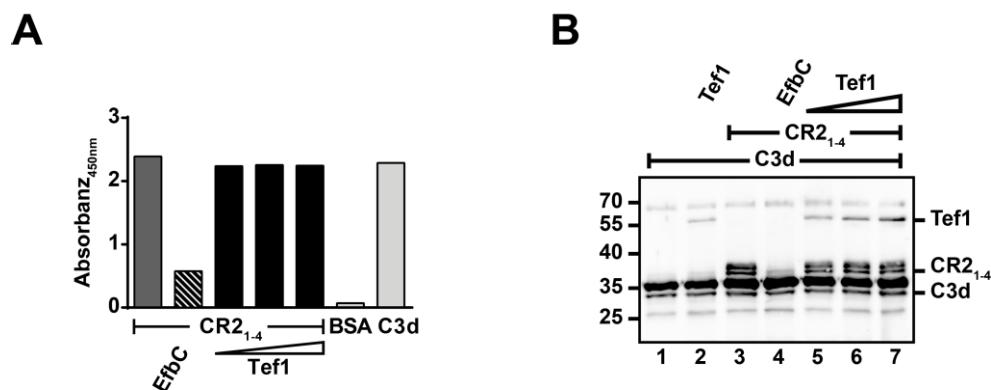


Abbildung 4.9: Tef1 beeinflusst nicht die Bindung von C3d an CR2

(A) Bindung von C3d an CR2₁₋₄ im ELISA. C3d wurde mit immobilisierten CR2₁₋₄ inkubiert und gebundenes C3d mit einem mouse anti-C3d-Antikörper (1:1000) detektiert. C3d band an CR2₁₋₄ und die Bindung wurde in Anwesenheit von EfbC inhibiert. Tef1 beeinflusste die Bindung von C3d an CR2₁₋₄ nicht. C3d band nicht an BSA. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. **(B)** Western Blot einer Immunpräzipitation. C3d wurde mit einem mouse anti-C3d-Antikörper präzipitiert und Tef1 (Spur 2) oder CR2₁₋₄ (Spur 3) wurden copräzipitiert. EfbC (Spur 4), nicht jedoch Tef1, inhibierte die Copräzipitation von CR2₁₋₄. Tef1 wurde zusammen mit C3d und CR2 copräzipitiert, der Effekt war dosisabhängig (Spuren 5-7). Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.10. Tef1 bindet den Komplementrezeptor 2 und teilt die Bindungsdomäne mit C3d

Nachdem gezeigt wurde, dass Tef1 an C3d bindet, jedoch nicht den Wirkmechanismus von EfbC nachstellt, sollte der Einfluss von Tef1 auf die Bindung zwischen C3d und CR2 näher charakterisiert werden. Es wurden zunächst die Wechselwirkungen aller beteiligten Proteine miteinander untersucht.

Hierzu wurde einerseits das Fragment CR2₁₋₄ verwendet, welches die SCRs 1-4 von CR2 umfasst und damit die Region (SCRs 1-2), welche die Bindung von CR2 und C3d vermittelt, sowie andererseits das Fragment CR2₃₋₄. CR2₁₋₄ (Abbildung 4.10A+C), nicht jedoch CR2₃₋₄ (Abbildung 4.10B+D), band an Tef1 und C3d. Sowohl Tef1 als auch C3d binden an die SCRs 1-2 von CR2 und teilen damit die Bindungsstelle im CR2-Protein.

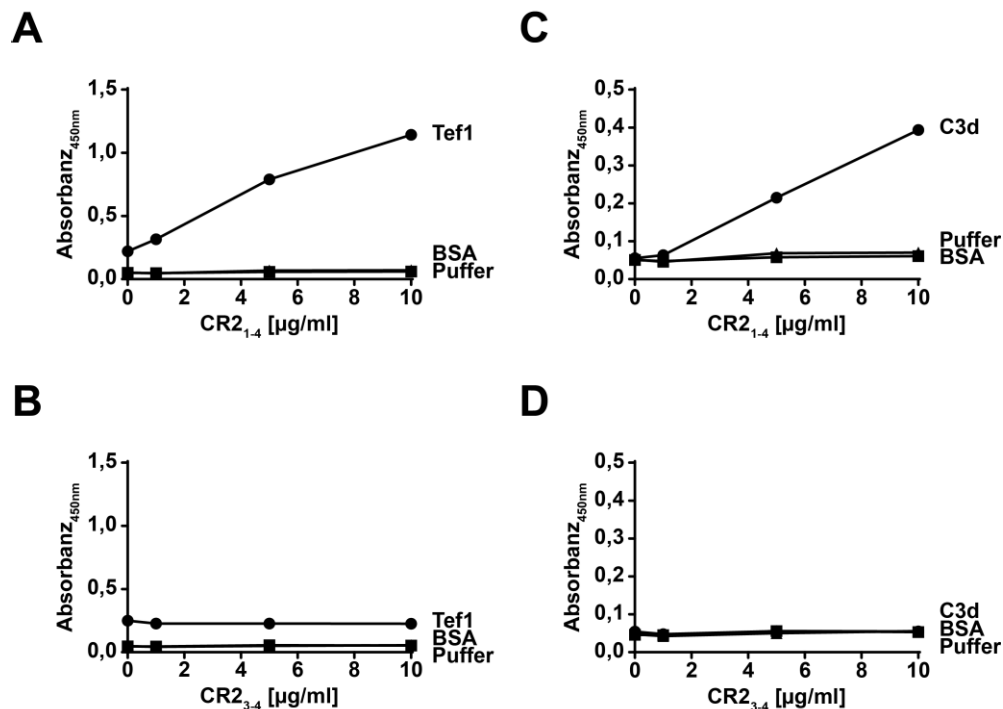


Abbildung 4.10: Tef1 bindet an CR2. Die Bindungsregion liegt in den SCRs 1-2

(A+B) Bindung von CR2 an Tef1 im ELISA. CR2₁₋₄ (A) oder CR2₃₋₄ (B) wurden mit immobilisiertem Tef1 inkubiert und gebundenes CR2 mit einem mouse anti-CR2-Antikörper (1:1000) detektiert. CR2₁₋₄ band an Tef1, nicht jedoch an BSA oder die Oberfläche der Mikrotiterplatte. CR2₃₋₄ band nicht an Tef1. **(C+D)** Bindung von CR2 an C3d im ELISA. CR2₁₋₄ (A) oder CR2₃₋₄ (B) wurden mit immobilisiertem C3d inkubiert und gebundenes CR2 mit einem mouse anti-CR2-Antikörper (1:1000) detektiert. CR2₁₋₄ band an C3d, nicht jedoch an BSA oder die Oberfläche der Mikrotiterplatte. CR2₃₋₄ band nicht an C3d. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.11. Tef1 bindet an den CR2-Rezeptor auf Raji-Zellen

Tef1 bindet neben C3d auch den Komplementrezeptor 2 (CR2, CD21). Es wurde in der Folge untersucht, ob Tef1 an oberflächenständiges CR2 bindet. Zu diesem Zweck wurde die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen bestimmt, welche CR2 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Rekombinantes Tef1 wurde mit Raji-Zellen inkubiert und die Bindung von Tef1 an die Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Tef1 band an Raji-Zellen; die Bindung war dosisabhängig (Abbildung 4.11A). Weiterhin wurde untersucht, ob CR2 ein Rezeptor für Tef1 an der Oberfläche von Raji-Zellen ist. Tef1 band an Raji-Zellen und die Bindung war in Gegenwart von löslichem CR2 vermindert (Abbildung 4.11B).

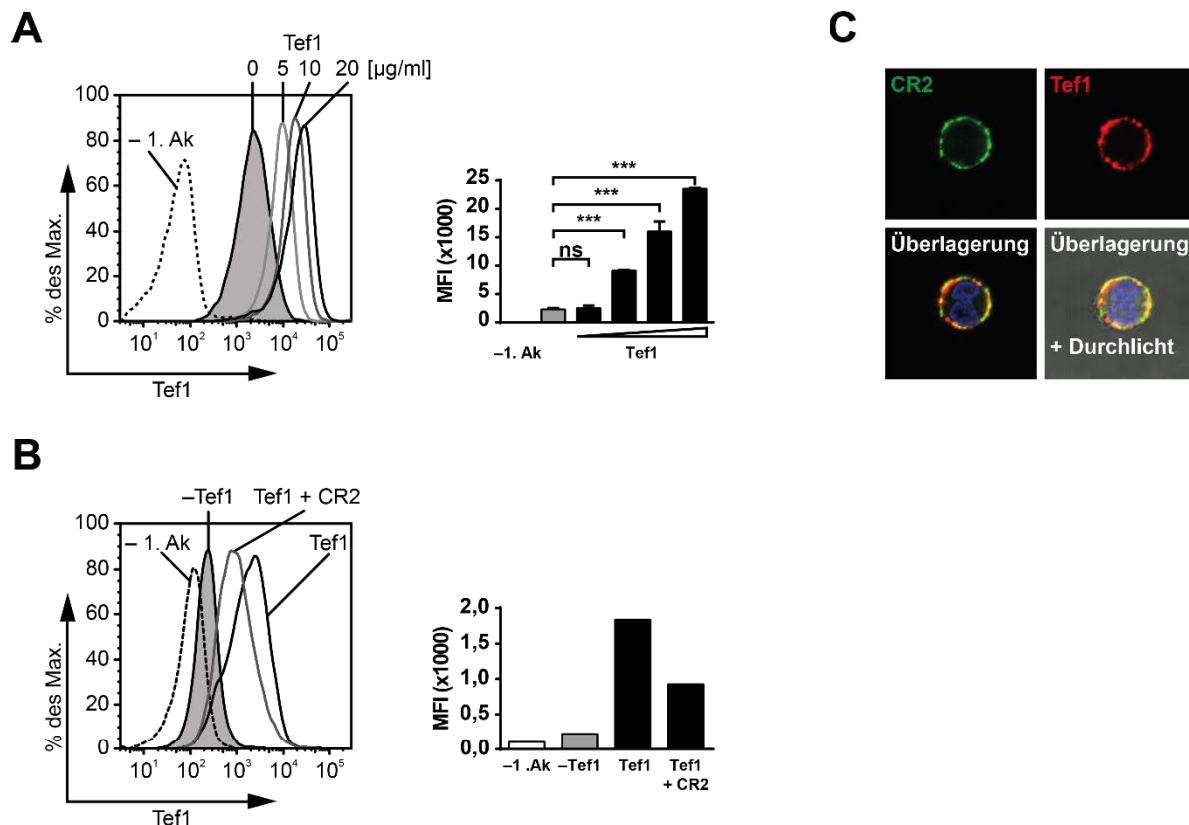


Abbildung 4.11: Tef1 bindet an Raji-Zellen via CR2

(A+B) Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung von Tef1 an Raji-Zellen. Raji-Zellen wurden mit Tef1 inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 wurde mit einem mouse anti-His-Antikörper (1:200) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-mouse-Antikörper detektiert. Tef1 band an Raji-Zellen. Die Bindung war dosisabhängig und signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,001$). **(B)** Lösliches CR2₁₋₄ inhibierte die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Raji-Zellen. Raji-Zellen wurden mit Tef1 inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 wurde mit einem rabbit anti-Tef1-Antiserum (1:50) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-rabbit-Antikörper (1:200) angefärbt. CR2 wurde mit einem mouse anti-CR2-Antikörper (1:50) sowie einem Alexa Fluor®488-konjugierten goat anti-mouse-Antikörper (1:200) angefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). An der Zelloberfläche colokalisierten CR2 (grün) und Tef1 (rot). Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die Bindung von Tef1 an CR2 auf der Oberfläche von Raji-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz bestätigt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten eine homogene Verteilung von CR2 auf der Zelloberfläche der Raji-Zellen (Abbildung 4.11C, oben links). Tef1 wurde spezifisch an der Zelloberfläche von Raji-Zellen detektiert (Abbildung 4.11C, oben rechts). Die Signale für CR2 und Tef1 waren deckungsgleich (Abbildung 4.11C, unten links), die beiden Proteine sind also an der Zelloberfläche colokalisiert.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 über CR2 an Raji-Zellen bindet.

4.12. Tef1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der Proteinkinasen CD19 in Raji-Zellen

Tef1 bindet sowohl das C3-Abbauprodukt C3d als auch den Komplementrezeptor 2 (CR2, CD21). Die Aktivierung von B-Zellen wird durch die Wechselwirkung von C3d mit CR2 verstärkt. Es sollte untersucht werden, ob Tef1 vermittelt seiner Interaktion mit C3d und CR2 die Aktivierung von B-Zellen beeinflusst.

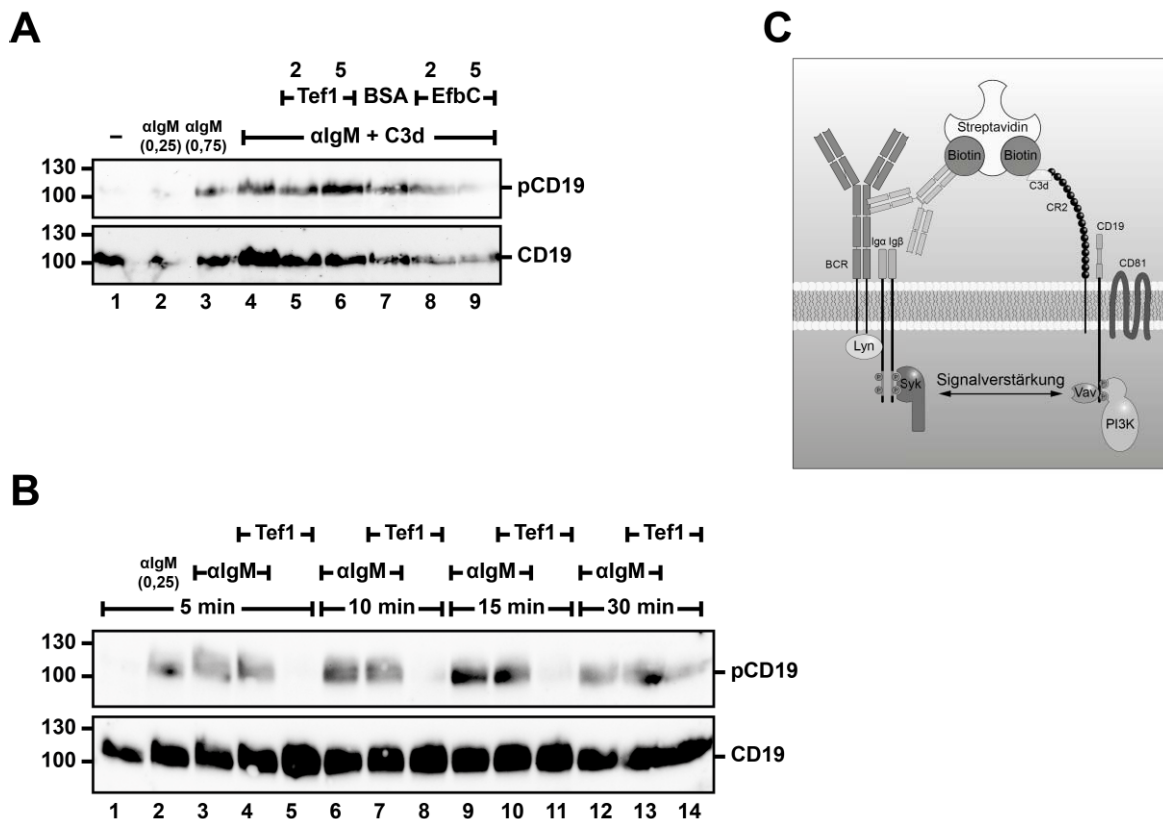


Abbildung 4.12: Tef1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von Raji-Zellen

(A+B) Western Blot von Raji-Zelllysaten. Phosphoryliertes CD19 (pCD19) wurde mit einem mouse anti-pCD19-Antikörper (1:1000), Gesamt-CD19 mit einem rabbit anti-CD19-Antiserum (1:1000) detektiert. **(A)** Die Stimulation mit B- α IgM resultierte in der Phosphorylierung von CD19, der Effekt war dosisabhängig (Spur 1-3). Durch Costimulation mit B-C3d nahm die Phosphorylierung zu (Spur 4). EfbC (Spuren 8-9) inhibierte die Zunahme der Phosphorylierung, Tef1 oder BSA (Spuren 5-7) nicht. **(B)** Mit B- α IgM stimulierte Raji-Zellen zeigten eine Phosphorylierung von CD19, der Effekt war dosisabhängig (Spur 1-3). Die Phosphorylierung von CD19 nahm mit zunehmender Stimulationsdauer bis zu 15 Minuten zu (Spuren 6 und 9) und im Anschluss wieder ab (Spur 12). Tef1 beeinflusste die Phosphorylierung von CD19 nicht (Spuren 4, 7, 10 und 13) und induzierte allein keine Phosphorylierung von CD19 (Spuren 5, 8, 11 und 14). Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. **(C)** Schematischer Aufbau der B-Zell-Stimulation.

Raji-Zellen wurden mit einem biotinylierten anti-IgM-Antikörper sowie C3d und Tef1 stimuliert. Die Stimulation der Zellen mit B-anti-IgM resultierte in der Phosphorylierung von CD19. Hierbei

wurde ein Schwellenwert bestimmt, oberhalb dessen B-anti-IgM die Phosphorylierung von CD19 hervorrief (Abbildung 4.12A, Spur 3), während eine unterschwellige Stimulation keine messbare Phosphorylierung auslöste (Spur 2). Wurden die Zellen mit B-IgM sowie B-C3d, welche über Streptavidin verbunden wurden (Abbildung 4.12C), stimuliert, wurde die Aktivierungsschwelle durch die Einbeziehung von C3d und des Corezeptorkomplexes um CR2 (CD21) derartig herabgesetzt, dass auch eine unterschwellige Konzentration von B-anti-IgM eine messbare Phosphorylierung von CD19 hervorrief (Abbildung 4.12A, Spur 4). Wurden die Zellen zudem mit Tef1 stimuliert, ergab sich keine Veränderung der Phosphorylierung von CD19 (Spuren 5+6). EfbC hingegen inhibierte die Phosphorylierung von CD19, der Effekt war dosisabhängig (Spuren 8+9). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine überschwellige Stimulation mit B-anti-IgM einen zeitabhängigen Phosphorylierungseffekt auf CD19 hat. Mit zunehmender Stimulationsdauer nahm die Phosphorylierung von CD19 zu (Abbildung 4.12B, Spuren 3+6) und erreichte das Maximum bei 15 Minuten (Spur 9) um danach wieder abzunehmen (Spur 12). Zu keinem der Zeitpunkte war ein Einfluss von Tef1 sichtbar (Spuren 4, 7, 10, 13). Tef1 als alleiniger Stimulus hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von CD19 (Spuren 5, 8, 11, 14).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 die Aktivierung von Raji-Zellen nicht beeinflusst. Weder existiert ein Effekt – ähnlich dem von EfbC – auf die Interaktion von C3d und CR2, noch beeinflusst Tef1 allein – beispielsweise über die Bindung an CR2 – die Aktivierung der Raji-Zellen.

4.13. Tef1 bindet an primäre Leukozyten

Die Bindung von Tef1 an Leukozyten innerhalb der PBMCs wurde untersucht und dabei verschiedene Subpopulationen unterschieden. PBMCs wurden mit fluoreszenzmarkiertem Tef1 inkubiert und die Bindung des Proteins anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Tef1 band an CD19⁺ Zellen der Lymphozytenpopulation (B-Zellen). Die Bindung war dosisabhängig. Weiterhin band Tef1 an CD3⁺ Zellen der Lymphozytenpopulation (T-Zellen). Die Bindung war dosisabhängig und zudem stärker als an B-Zellen. Des Weiteren band Tef1 an CD14⁺ Zellen der Monozytenpopulation. Die Bindung war dosisabhängig und zudem stärker als an B- und T-Zellen (Abbildung 4.13).

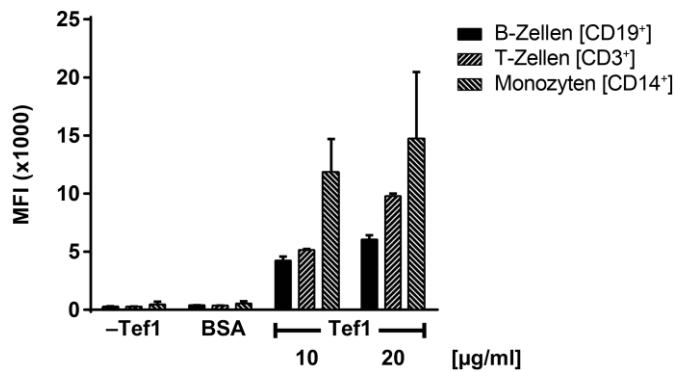


Abbildung 4.13: Tef1 bindet an primäre humane Leukozyten

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung von Tef1 an primäre humane B-Zellen, T-Zellen und Monozyten innerhalb von PBMCs. PBMCs wurden mit Alexa Fluor®647-konjugiertem Tef1 inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Tef1 band an CD19⁺ B-Zellen, CD3⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten. Die Bindung war dosisabhängig. Alexa Fluor®647-konjugiertes BSA band nicht an die Zellen. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.14. Tef1 induziert die Produktion von IL-10 in PBMCs

Tef1 bindet über CR2 an Raji-Zellen, hat jedoch keinen Effekt auf die Aktivierung dieser Zellen. Weiterhin bindet Tef1 an primäre B-Zellen innerhalb der PBMCs. Es stellte sich die Frage, ob Tef1 primäre B-Zellen beeinflusst. B-Zellen stellen im menschlichen Körper eine potente Quelle von Zytokinen dar [111]. Daher wurde untersucht, ob Tef1 die Produktion von Zytokinen durch PBMCs und insbesondere durch B-Zellen beeinflusst.

PBMCs wurden mit Stimuli spezifisch für bestimmte Zell-Subpopulationen sowie Tef1 inkubiert und die von den Zellen sezernierten Zytokine mittels ELISA quantitativ bestimmt. Tef1 induzierte in PBMCs die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10. Der Effekt war dosisabhängig. Wurden PBMCs zudem mit einem B-Zell-spezifischen Stimulus versetzt (α IgM + α CD40), verstärkte Tef1 die Produktion von IL-10. Der Effekt von Tef1 war dosisabhängig. Wurden spezifisch die in den PBMCs enthaltenen T-Zellen stimuliert (α CD3), zeigte sich eine erhöhte Produktion von IL-10, welche durch Tef1 weiter verstärkt wurde. Der Effekt von Tef1 war dosisabhängig (Abbildung 4.14A). Weiterhin wurde die Produktion von pro-inflammatorischem IFN- γ untersucht. Sowohl in unstimulierten PBMCs als auch bei B-Zell-spezifischer Stimulation war kein IFN- γ nachzuweisen. Tef1 beeinflusste die Produktion von IFN- γ nicht. Wurden spezifisch die T-Zellen stimuliert, produzierten die Zellen IFN- γ und Tef1 verstärkte die Produktion. Der Effekt von Tef1 war dosisabhängig (Abbildung 4.14B).

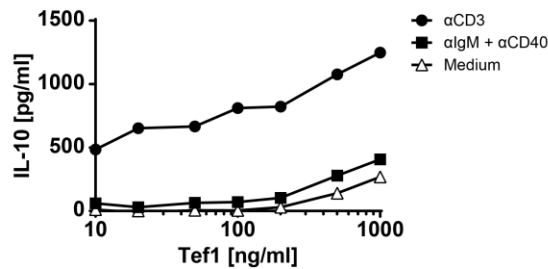
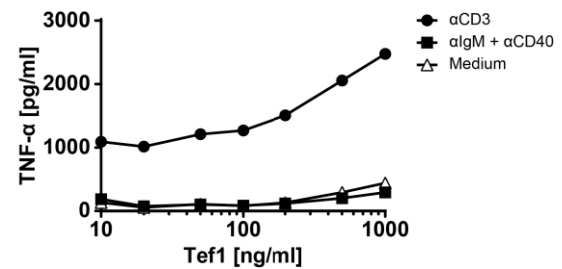
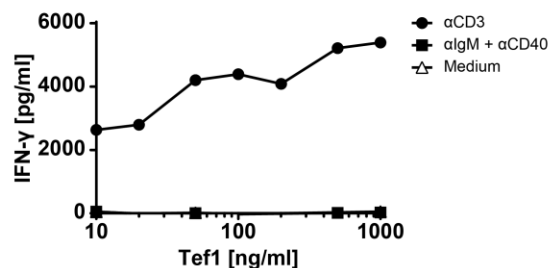
A**C****B**

Abbildung 4.14: Tef1 induziert die Produktion von Zytokinen in PBMCs

(A-C) Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen. PBMCs wurden mit Tef1 und T-Zell- (αCD3) bzw. B-Zell-spezifischen (αIgA/G/M + αCD40) Stimuli inkubiert und sezernierte Zytokine wurden mittels ELISA quantifiziert. **(A)** Tef1 allein induzierte die Produktion von IL-10 in PBMCs und verstärkte die Produktion von IL-10 in T- und B-Zellen, der Effekt war dosisabhängig. **(B)** Tef1 verstärkte die Produktion von IFN-γ in T-Zellen, nicht aber in B-Zellen und hatte allein keinen Effekt auf die Zytokinproduktion. **(C)** Tef1 verstärkte die Produktion von TNF-α in T-Zellen und geringfügig in B-Zellen und hatte allein keinen Effekt auf die Zytokinproduktion. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Tef1 verstärkte die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF-α in unstimulierten PBMCs. Der Effekt war dosisabhängig. Wurden PBMCs zudem mit einem B-Zell-spezifischen Stimulus versetzt, zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Produktion von TNF-α in Abhängigkeit von Tef1. Der Effekt von Tef1 war allerdings geringer als in unstimulierten Zellen. Wurden spezifisch die in den PBMCs enthaltenen T-Zellen stimuliert, produzierten die Zellen große Mengen TNF-α und Tef1 verstärkte die Produktion. Der Effekt von Tef1 war dosisabhängig und stärker als in unstimulierten Zellen (Abbildung 4.14C).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 die Produktion von Zytokinen in PBMCs beeinflusst. IL-10 und TNF-α, nicht aber IFN-γ werden induziert. Bei zellspezifischer Stimulation verstärkt Tef1 die Produktion von IL-10, IFN-γ und TNF-α in T-Zellen sowie die Produktion von IL-10 in B-Zellen, während Tef1 die Produktion von IFN-γ nicht beeinflusst.

4.15. Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs

Tef1 bindet an primäre B-Zellen innerhalb der PBMCs und moduliert die B-Zell-abhängige Produktion von Zytokinen. Die Mehrzahl der B-Zellen im menschlichen Blut (peripher) ist naiv, d.h. noch nicht mit Antigenen in Kontakt geraten [3]. Werden diese Zellen in Folge eines Antigenkontaktes aktiviert, differenzieren sie zu Plasmablasten und Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Es wurde untersucht, ob Tef1 die Differenzierung von B-Zellen beeinflusst.

PBMCs wurden durch PWM (*pokeweed mitogen*) zur Differenzierung angeregt und während des Differenzierungsprozesses zusätzlich mit Tef1 versetzt. Im Anschluss wurden differenzierte und nicht differenzierte B-Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch identifiziert. Alle B-Zellen sind CD19⁺. Naive, nicht differenzierte B-Zellen exprimieren IgD stark und CD27 schwach. Dagegen sind differenzierte B-Zellen IgD⁻/CD27⁺ (Plasmablasten). Durch die Stimulation der Zellen mit PWM differenzierten B-Zellen zu Plasmablasten. Tef1 verstärkte die Differenzierung von B-Zellen (Abbildung 4.15A). Der Effekt war dosisabhängig (Abbildung 4.15B). Plasmablasten, die in Folge der Stimulation mit Tef1 differenzieren, exprimieren mehr CD24 sowie CD38, als Plasmablasten, deren Differenzierung einzig durch PWM induziert wurde (Abbildung 4.15C). Die Oberflächenmarker CD24 und CD38 sind charakteristisch für regulatorische B-Zellen vom Plasmablasten-Typ [131]. Im Anschluss an die Differenzierung wurden die Zytokine IL-10 und TNF- α in den Überständen der Zellkulturen quantifiziert. Tef1 erhöhte die Menge des gebildeten IL-10. Der Effekt war dosisabhängig und signifikant (Abbildung 4.15D). Tef1 reduzierte die Menge des sezernierten TNF- α . Der Effekt war dosisabhängig und signifikant (Abbildung 4.15E).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 die Differenzierung von B-Zellen innerhalb der PBMCs verstärkt. Die dabei entstehenden Zellen sind Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp. Zudem steigert Tef1 die Bildung von anti-inflammatorischem IL-10, während die Produktion von pro-inflammatorischem TNF- α inhibiert wird.

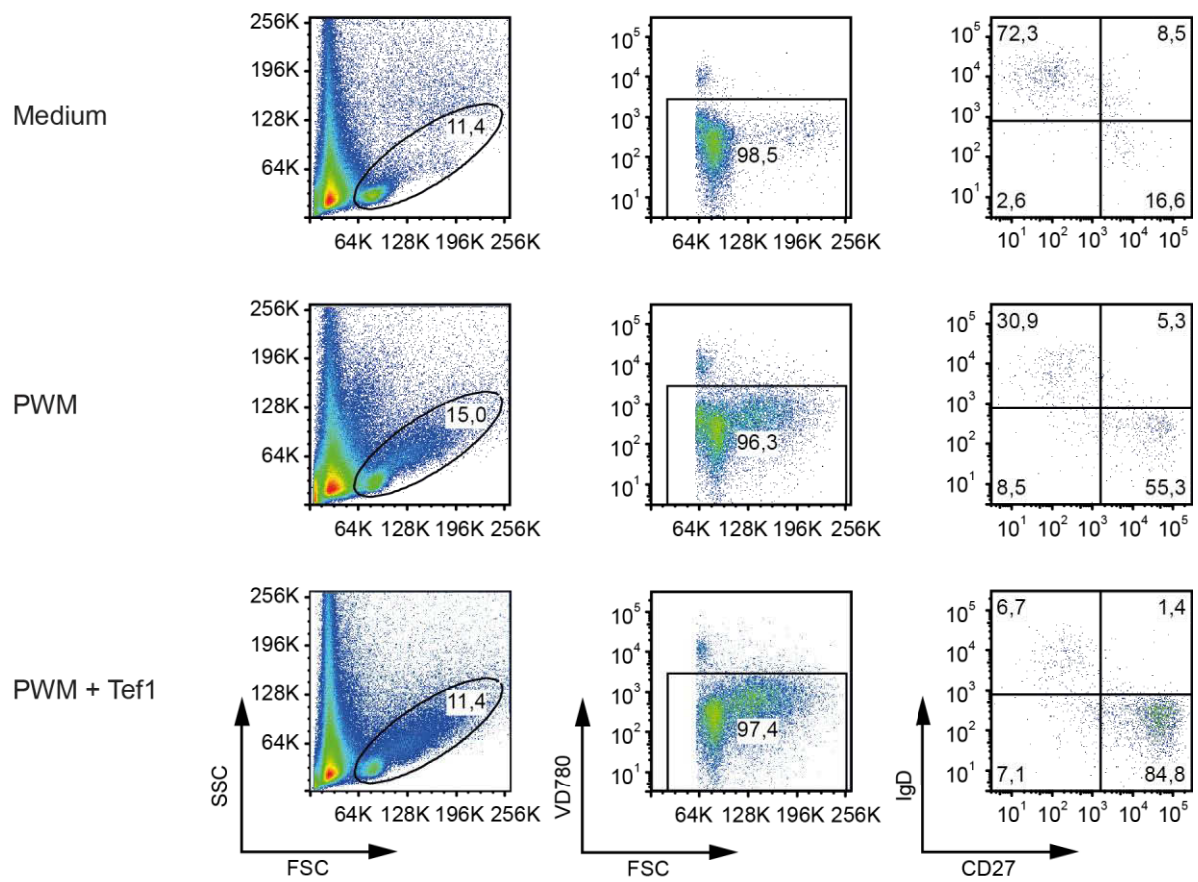
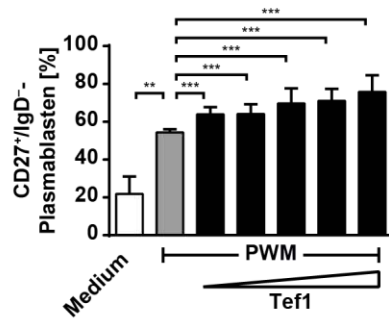
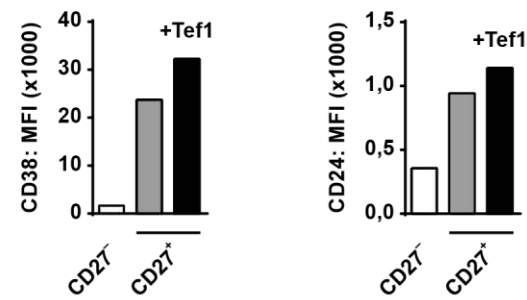
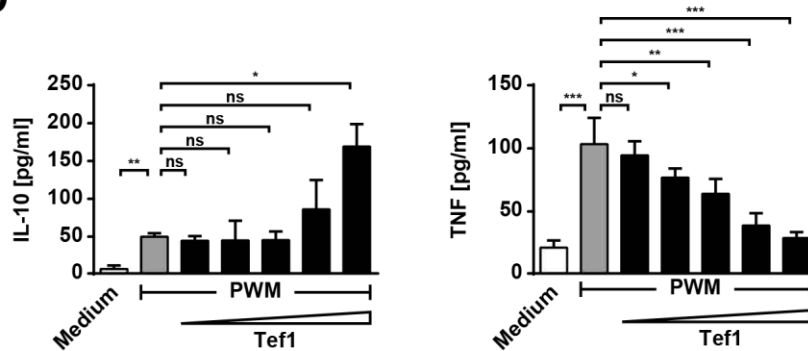
A**B****C****D**

Abbildung 4.15: Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs

(A) Durchflusszytometrische Evaluierung der Differenzierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs. PBMCs wurden mit PWM (40 ng/ml) stimuliert. B-Zellen wurden anhand von Größe (FSC) und Granularität (SSC) (links), einer Lebend-Tot-Färbung (Mitte) und als CD19⁺ selektiert. Die Differenzierung von CD19⁺ B-Zellen wurde anhand der Expression von IgD und CD27 bestimmt (rechts). IgD⁺/CD27⁻ B-Zellen sind undifferenziert, während IgD⁺/CD27⁺ B-Zellen differenzierte Plasmablasten sind. Während in unstimulierten Proben nur wenige Plasmablasten vorlagen (rechts oben), induzierte die Stimulation mit PWM die Differenzierung von Plasmablasten (rechts Mitte). Der Effekt von PWM wurde durch Tef1 verstärkt (rechts unten). Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. **(B)** Quantifizierung der Differenzierung von B-Zellen. Durch Stimulation mit PWM wurde der Anteil der IgD⁺/CD27⁺ Plasmablasten innerhalb der CD19⁺ B-Zellen signifikant erhöht. Tef1 erhöhte den Anteil der Plasmablasten. Der Effekt von Tef1 war dosisabhängig und signifikant. **(C)** Durchflusszytometrische Quantifizierung der Expression von Oberflächenmarkern. CD27⁺ Plasmablasten exprimierten CD24 und CD38, undifferenzierte B-Zellen (CD27⁻) nicht. Durch Tef1 induzierte Plasmablasten zeigten eine verstärkte Expression dieser beiden Oberflächenmarker. Ein repräsentatives Ergebnis von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ist gezeigt. **(D+E)** Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen von mit PWM stimulierten PBMCs. **(D)** PWM induzierte die Produktion von IL-10 und Tef1 verstärkte diese. Der Effekt war dosisabhängig und signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,05$). **(E)** PWM induzierte die Produktion von TNF- α , Tef1 inhibierte diese. Der Effekt war dosisabhängig und signifikant ($p < 0,001$).

4.16. Tef1 bindet an primäre B-Zellen via CR2

Tef1 bindet spezifisch an B-Zellen innerhalb der PBMCs und beeinflusst deren Zytokinproduktion und Differenzierung. Tef1 bindet an Raji-Zellen über den Komplementrezeptor 2 (CR2, CD21). Es wurde in der Folge untersucht, ob Tef1 an reine, aus PBMCs isolierte, primäre humane B-Zellen bindet, ob diese Bindung ebenfalls über CR2 erfolgt und ob weitere B-Zell-Oberflächenrezeptoren an der Bindung von Tef1 an primäre B-Zellen beteiligt sind.

Primäre humane B-Zellen wurden mit Tef1 inkubiert und gebundenes Tef1 durchflusszytometrisch quantifiziert. Tef1 band spezifisch an B-Zellen, der Effekt war dosisabhängig (Abbildung 4.16A). Zur Identifizierung neuer, potentieller Oberflächenrezeptoren von Tef1 auf primären B-Zellen wurde Tef1 in Mikrotiterplatten immobilisiert und mit den Kandidatenproteinen inkubiert. Gebundenes Protein wurde jeweils mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die B-Zell-Oberflächenrezeptoren CD22, CR1 (CD35) sowie CD40 banden an Tef1. Die Bindung war jeweils dosisabhängig (Abbildung 4.16B). In Gegenwart von löslichem CR2₁₋₄ war die Bindung von Tef1 an B-Zellen reduziert, während lösliches CR1, CD22 oder CD40 die Bindung von Tef1 an B-Zellen nicht beeinflussten (Abbildung 4.16C). Durch Bindung von löslichem CR2₁₋₄ an Tef1 wird die Interaktionsregion von Tef1 für CR2 besetzt. Somit kann Tef1 nicht länger an membranständiges CR2 binden. Dies legt nahe, dass Tef1 über CR2 an B-Zellen bindet.

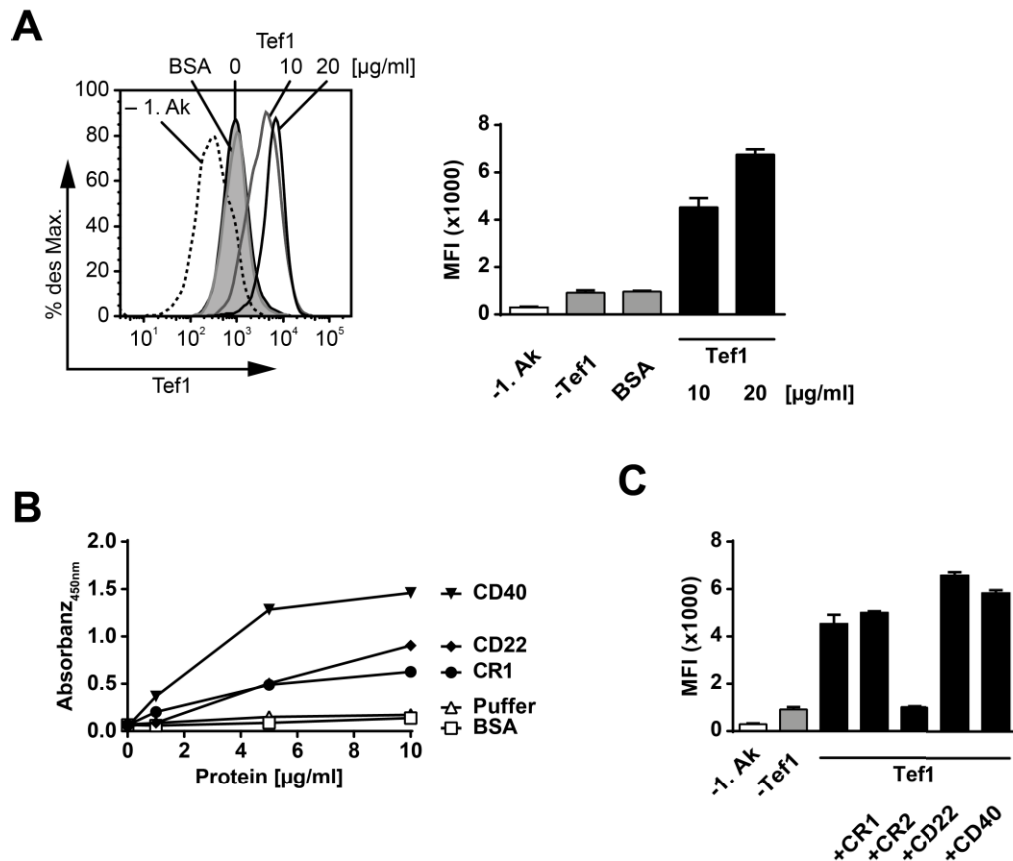


Abbildung 4.16: Tef1 bindet an primäre B-Zellen via CR2

(A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung von Tef1 an primäre humane B-Zellen. Tef1 wurde mit B-Zellen inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 mittels eines rabbit anti-Tef1-Antiserums (1:200) sowie eines Alexa Fluor®647-markierten goat anti-rabbit-Antikörpers (1:400) detektiert. Tef1 band an B-Zellen und die Bindung war dosisabhängig. **(B)** Bindung von CD22, CR1 und CD40 an Tef1 im ELISA. Die Proteine wurden mit immobilisiertem Tef1 inkubiert und mit einem mouse anti-CD22-Antikörper, einem mouse anti-CD35-Antikörper oder einem mouse anti-CD40-Antikörper detektiert (jeweils 1:1000). CD22, CR1 und CD40 banden an Tef1 und die Bindung war dosisabhängig. Keines der Proteine band an BSA oder die Oberfläche der Mikrotiterplatte. **(C)** Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung von Tef1 an primäre humane B-Zellen. B-Zellen wurden mit Tef1 inkubiert und oberflächengebundenes Tef1 wurde mit einem rabbit anti-Tef1-Antikörper (1:200) sowie einem Alexa Fluor®647-konjugierten goat anti-mouse-Antikörper (1:400) detektiert. Tef1 band an B-Zellen und lösliches CR2₁₋₄ inhibierte die Bindung. Der Effekt von CR2₁₋₄ war signifikant. Weder lösliches CR1, noch CD22 oder CD40 inhibierten die Bindung von Tef1 an B-Zellen. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.17. Tef1 induziert die Produktion von IL-10 in B-Zellen

Tef1 bindet innerhalb von PBMCs spezifisch an B-Zellen und induziert die Produktion von IL-10. Weiterhin verstärkt Tef1 die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp. Es stellte sich die Frage, ob diese Effekte durch die direkte Wirkung von

Tef1 auf B-Zellen hervorgerufen wurden oder aber das Resultat einer konzertierten und möglicherweise indirekten Wirkung von Tef1 waren, indem etwa andere Zellen der PBMCs durch Tef1 stimuliert wurden und daraufhin die B-Zellen beeinflussten. Daher wurden in der Folge die Effekte von Tef1 auf reine, aus PBMCs isolierte, primäre humane B-Zellen untersucht.

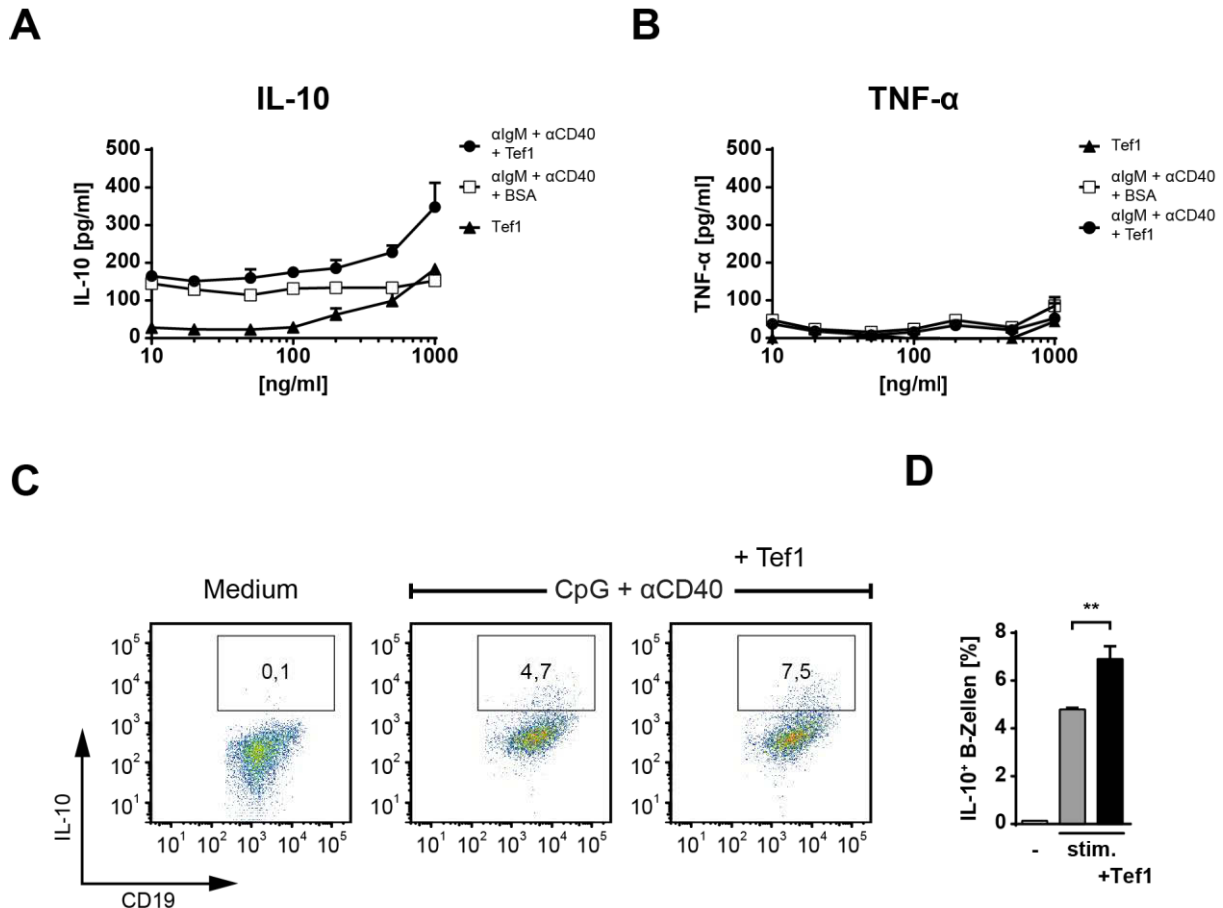


Abbildung 4.17: Tef1 induziert die Produktion von IL-10 in B-Zellen

(A+B) Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen. Reine, aus PBMCs isolierte, primäre humane B-Zellen wurden B-Zell-spezifischen Stimuli (algA/G/M + α CD40) sowie Tef1 bzw. BSA inkubiert und sezernierte Zytokine wurden mittels ELISA quantifiziert. **(A)** Tef1 allein induzierte die Produktion von IL-10 in B-Zellen und verstärkte die Produktion von IL-10 bei Stimulation der Zellen, der Effekt war dosisabhängig. BSA beeinflusste die IL-10-Produktion von stimulierten B-Zellen nicht. **(B)** Tef1 allein beeinflusste die Produktion von TNF- α nicht und hatte auch in stimulierten B-Zellen, ebenso wie BSA, keinen Effekt auf die Zytokinproduktion. **(C)** Durchflusszytometrische Quantifizierung von intrazellulärem IL-10. B-Zellen wurden mit B-Zell-spezifischen Stimuli (CpG + α CD40) sowie Tef1 inkubiert. CD19⁺ B-Zellen produzierten IL-10. Tef1 erhöhte den Anteil der IL-10⁺ B-Zellen. **(D)** Quantifizierung der intrazellulären Bestimmung von IL-10. Die Stimulation der B-Zellen erhöhte den Anteil der IL-10⁺ B-Zellen. Tef1 steigerte den Anteil der IL-10⁺ Zellen weiter. Der Effekt von Tef1 war signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,01$). Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Unstimulierte B-Zellen produzierten kein IL-10. Tef1 induzierte die Produktion von IL-10 in B-Zellen. Der Effekt war dosisabhängig. Wurden B-Zellen spezifisch stimuliert (anti-IgM + anti-CD40), produzierten die Zellen IL-10 und Tef1 verstärkte die Produktion. Der Effekt war dosisabhängig. BSA beeinflusste die Produktion von IL-10 nicht (Abbildung 4.17A). Unstimulierte B-Zellen produzierten kein TNF- α und Tef1 beeinflusste die Produktion von TNF- α nicht. Wurden die B-Zellen spezifisch stimuliert, veränderte sich die Produktion von TNF- α nicht und Tef1 beeinflusste die Produktion von TNF- α nicht. Auch BSA beeinflusste die Produktion von TNF- α nicht (Abbildung 4.17B). Von B-Zellen produziertes IL-10 wurde intrazellulär durchflusszytometrisch quantifiziert. Unstimulierte CD19⁺ B-Zellen produzierten kein IL-10. Durch spezifische Stimulation der B-Zellen wurden diese zur Produktion von IL-10 angeregt. Tef1 verstärkte die Produktion von IL-10 in B-Zellen, der Effekt war signifikant (Abbildung 4.17C+D). Damit wurde bestätigt, dass IL-10 direkt von B-Zellen produziert wurde und Tef1 die Produktion von IL-10 verstärkte.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 direkt auf reine, aus PBMCs isolierte, primäre humane B-Zellen wirkt und die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 verstärkt, während die Produktion von pro-inflammatorischem TNF- α nicht beeinflusst wird.

4.18. Tef1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen

Tef1 bindet über CR2 an primäre humane B-Zellen und induziert die Produktion von IL-10 in diesen Zellen. Es stellte sich die Frage, ob Tef1 auch längerfristige Effekte auf B-Zellen ausübt. Daher wurde untersucht, ob Tef1 die Proliferation dieser Zellen beeinflusst.

B-Zellen wurden zur Proliferation angeregt und zusätzlich mit Tef1 versetzt. Durch die spezifische Stimulation proliferierten die B-Zellen. Tef1 beeinflusste die Proliferation von B-Zellen nicht (Abbildung 4.18A unten). Die Aktivierung von CR1 dagegen inhibierte die Proliferation der B-Zellen (Abbildung 4.18B).

Die durch Tef1 induzierte Produktion von IL-10 hat also keinen Effekt auf die Proliferation von B-Zellen.

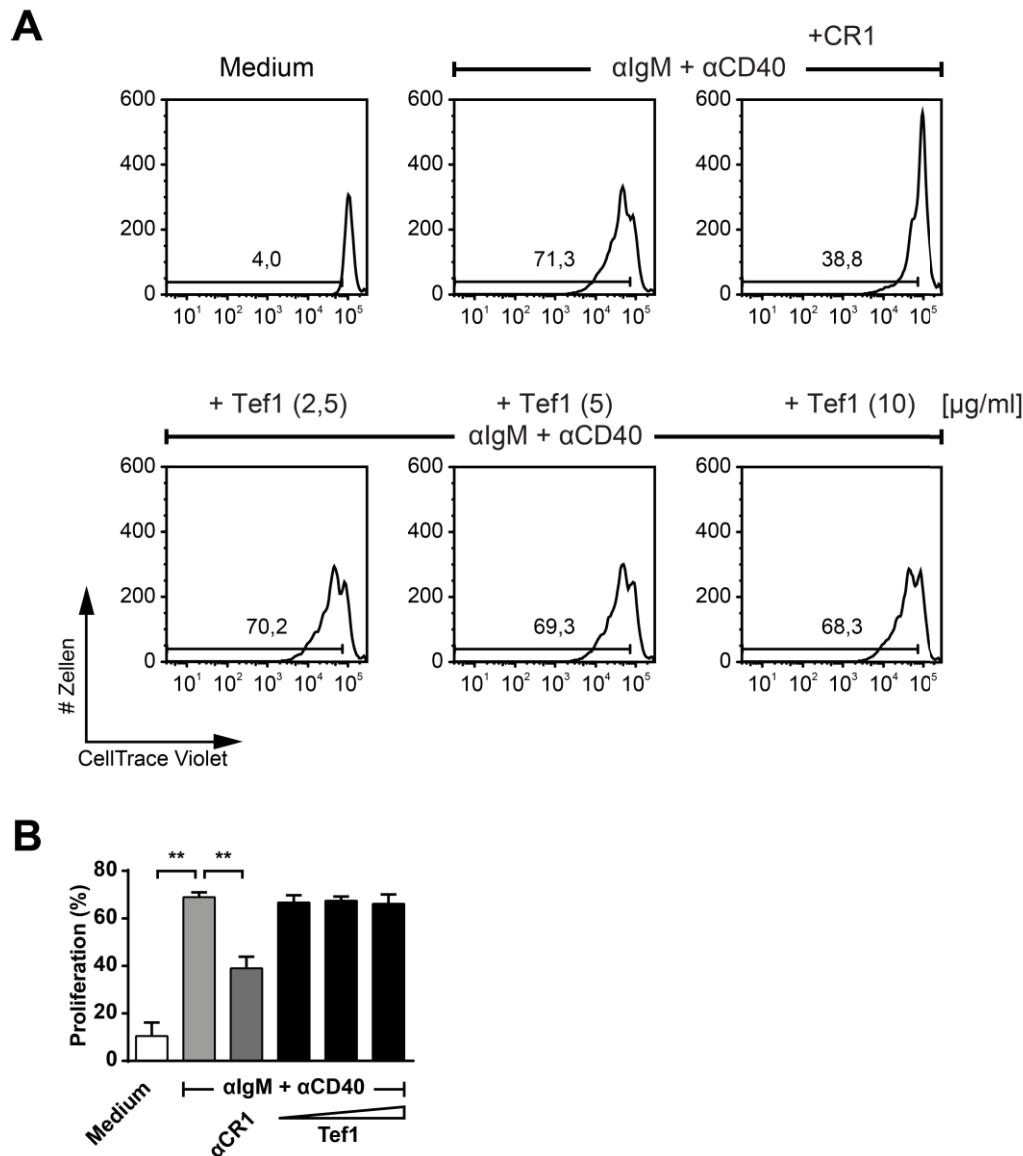


Abbildung 4.18: Tef1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen

(A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der B-Zell-Proliferation. Primäre humane B-Zellen wurden mit CellTrace™ Violet markiert und zur Proliferation angeregt (αlgA/G/M + αCD40). Tochtergenerationen zeigen ein reduziertes CTV-Signal. Der Anteil der proliferierten Zellen an allen B-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Stimulierte B-Zellen zeigten Proliferation (oben Mitte), diese wurde durch Stimulation von CR1 inhibiert (oben rechts), nicht jedoch durch Tef1 (unten). Ein exemplarisches Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. **(B)** Statistische Auswertung der B-Zell-Proliferation. Durch Stimulation proliferierten die B-Zellen. Der Anstieg der Proliferation war signifikant. CR1 inhibierte die Proliferation, der Effekt war signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,01$). Tef1 hatte keinen Effekt auf die Proliferation von B-Zellen. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.19. Tef1 induziert die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen

Tef1 ist ein Ligand von CR2 auf B-Zellen und induziert die Produktion von IL-10, indem es direkt auf die B-Zellen wirkt. Weiterhin verstärkte Tef1 die Differenzierung von B-Zellen innerhalb der heterogenen PBMCs. Allerdings war aufgrund der Anwesenheit weiterer Zellen innerhalb der PBMCs unklar, ob diesem Effekt eine direkte Interaktion von Tef1 mit B-Zellen zugrunde lag. Es wurde daher untersucht, ob Tef1 direkt auf gereinigte primäre B-Zellen wirkt und so deren Differenzierung beeinflusst.

Primäre humane B-Zellen wurden durch Stimulation (α lgM + α CD40 + IL-2 + IL-10) zur Differenzierung angeregt und zusätzlich mit Tef1 versetzt. Tef1 verstärkte die Differenzierung der B-Zellen, sodass der Anteil der differenzierten IgD⁺/CD27⁺ B-Zellen zunahm (Abbildung 4.19A). Die Tef1-induzierten Plasmablasten sind CD20⁻, CD24⁺ und CD38⁺ (nicht gezeigt). Tef1 erhöhte den Anteil der differenzierten B-Zellen auf 36 % (Abbildung 4.19B). Dies bestätigt die Ergebnisse der Differenzierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs. Weiterhin wurde untersucht, ob im Zuge der Tef1-induzierten Zunahme der B-Zell-Differenzierung der Anteil der IL-10-produzierenden Zellen zunahm. In Folge der Stimulation produzierten 3 % der B-Zellen IL-10 (IL-10⁺). Tef1 steigerte den Anteil der IL-10⁺ B-Zellen auf 14 % (Abbildung 4.19C). Weiterhin war innerhalb der Tef1-induzierten IL-10⁺ B-Zellen der Anteil der CD27⁺/CD38⁺-Plasmablasten größer als innerhalb der IL-10⁻ Zellen. Somit besteht eine Korrelation zwischen der Tef1-induzierten Bildung von IL-10⁺ Zellen und der verstärkten Differenzierung von Plasmablasten (Abbildung 4.19E). Differenzierte B-Zellen produzierten IgG und Tef1 steigerte die Produktion (Abbildung 4.19D).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Tef1 direkt auf primäre humane B-Zellen wirkt und hierbei die Differenzierung der Zellen verstärkt. Unter dem Einfluss von Tef1 nimmt der Anteil der Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp (IL-10⁺) zu.

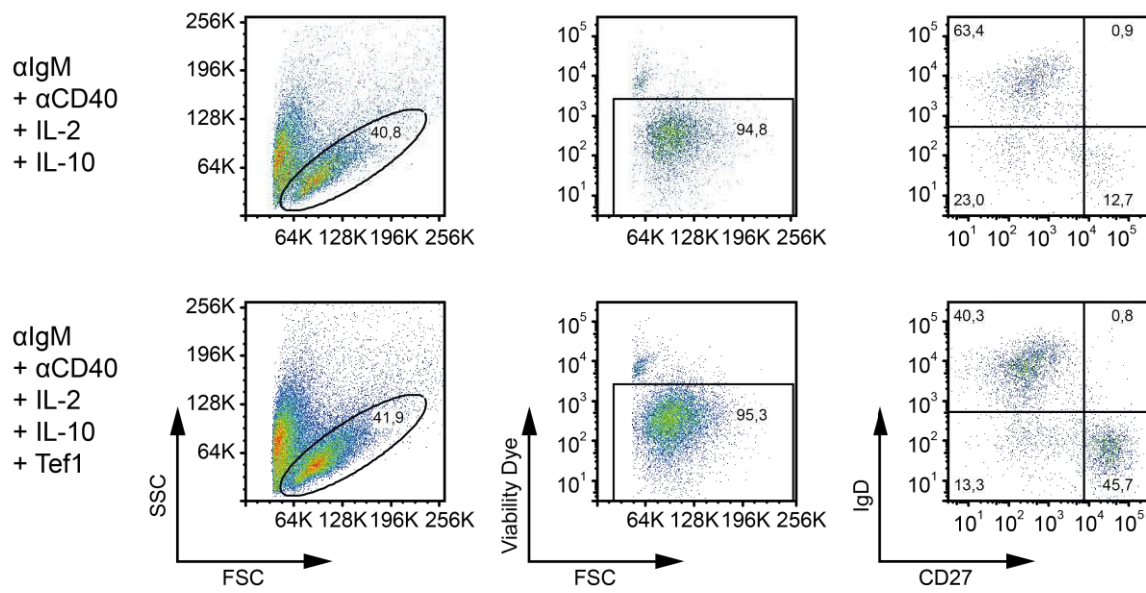
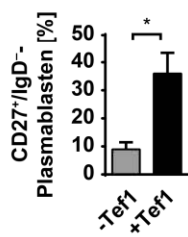
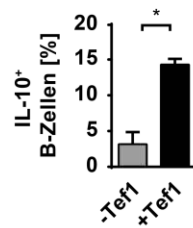
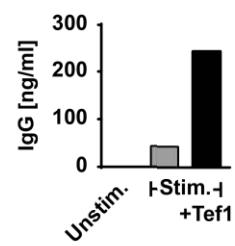
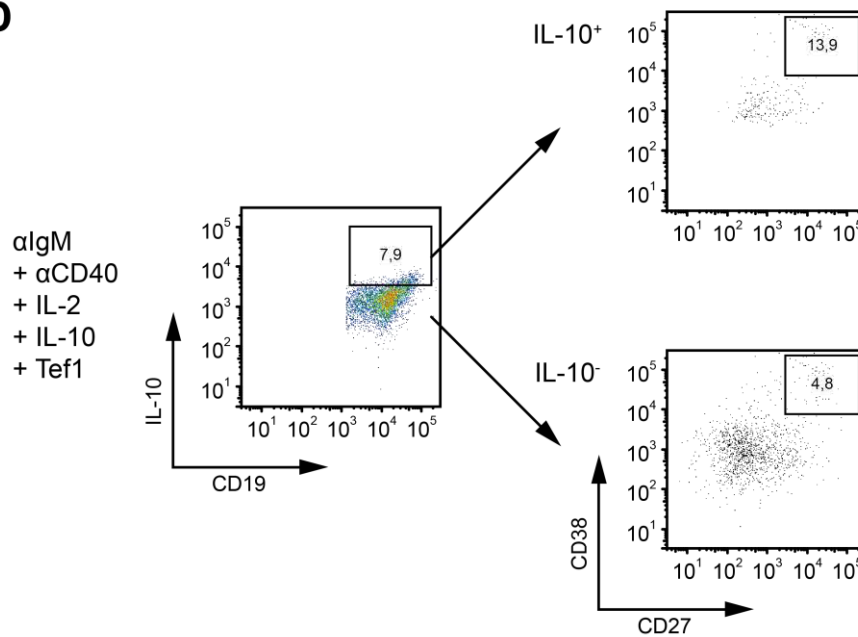
A**B****C****E****D**

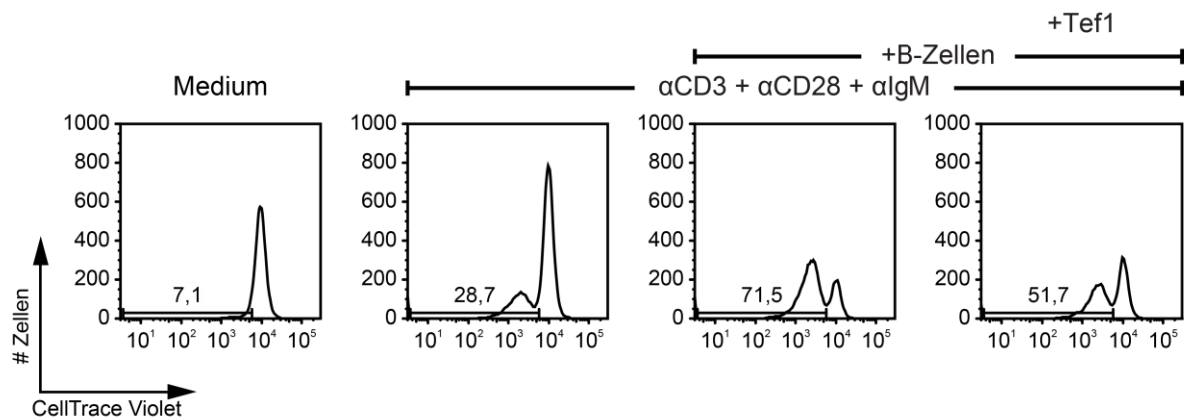
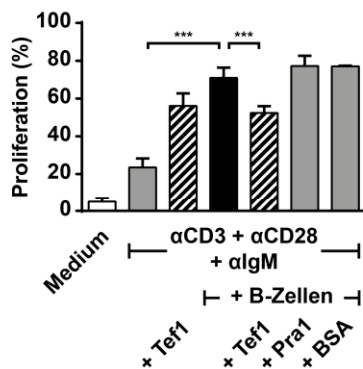
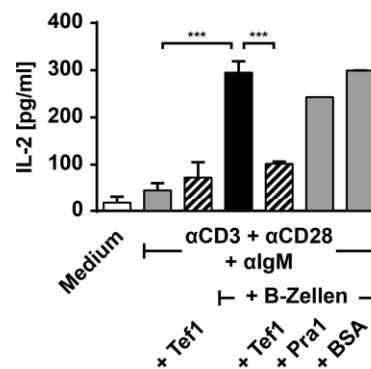
Abbildung 4.19: Tef1 induziert die Differenzierung von regulatorischen Plasmablasten

(A) Durchflusszytometrische Evaluierung der Differenzierung von B-Zellen. B-Zellen wurden zur Differenzierung angeregt (α lgA/G/M + α CD40 + IL-2 + IL-10). B-Zellen wurden anhand von Größe (FSC) und Granularität (SSC) (links), einer Lebend-Tot-Färbung (Mitte) sowie einer CD19-Färbung selektiert. Die Differenzierung von CD19⁺ B-Zellen wurde anhand der Expression von IgD und CD27 bestimmt (rechts). Undifferenzierte B-Zellen sind IgD⁺/CD27⁻, während differenzierte Plasmablasten IgD⁻/CD27⁺ sind. Während in stimulierten Proben nur wenige Plasmablasten vorlagen (rechts oben), induzierte Tef1 die Bildung von Plasmablasten (rechts unten). **(B)** Quantifizierung der Differenzierung von B-Zellen. Tef1 verstärkte die Differenzierung von Plasmablasten aus stimulierten B-Zellen. Der Effekt war signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,05$). **(C)** Durchflusszytometrische Quantifizierung von intrazellulärem IL-10 in CD19⁺ B-Zellen. B-Zellen wurden spezifisch zur Differenzierung angeregt und IL-10-produzierende Zellen detektiert. Tef1 erhöhte die Anzahl IL-10-produzierender B-Zellen. Der Effekt war signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,05$). **(D)** Bestimmung von IgG in Kulturüberständen der B-Zell-Differenzierung aus **(A)** mittels ELISA. Durch Stimulation produzierten B-Zellen IgG, Tef1 verstärkte die Bildung von IgG. Ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ist gezeigt. **(E)** Innerhalb der IL-10⁺ B-Zellen ist der Anteil der CD27⁺/CD38⁺ Plasmablasten größer als innerhalb der IL-10⁻ B-Zellen. Die Tef1-induzierte verstärkte Bildung von IL-10⁺ B-Zellen korrelierte mit der Differenzierung von Plasmablasten. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.20. Tef1-induzierte B-Zellen inhibieren die Proliferation von T-Zellen

Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen und induziert dabei Plasmablasten vom regulatorischen Phänotyp (regulatorische B-Zellen, B_{regs}). Regulatorische B-Zellen inhibieren die Proliferation von T-Zellen [131]. Daher wurde untersucht, ob Tef1-induzierte regulatorische B-Zellen die Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

CD4⁺ T-Zellen proliferierten in Anwesenheit von B- und T-Zell-spezifischen Stimuli. Die Proliferation wurde durch B-Zellen verstärkt. Tef1 verminderte den proliferationsfördernden Effekt von B-Zellen (Abbildung 4.20A). Das Protein Pra1 von *C. albicans* oder BSA inhibierten den proliferationsfördernden Effekt von B-Zellen nicht (Abbildung 4.20B). Die Proliferation von T-Zellen ging einher mit der Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2. In Anwesenheit B- und T-Zell-spezifischer Stimuli wurde IL-2 produziert, Tef1 verstärkte die Produktion nicht. Durch B-Zellen nahm die Menge an IL-2 zu. Tef1 reduzierte den Effekt der B-Zellen. Pra1 und BSA beeinflussten die B-Zell-abhängige Erhöhung der IL-2-Produktion nicht (Abbildung 4.20C).

A**B****C****Abbildung 4.20: Tef1-induzierte B-Zellen inhibieren die T-Zell-Proliferation**

(A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der T-Zell-Proliferation. Primäre humane $CD4^+$ T-Zellen wurden mit CellTrace™ Violet markiert und zusammen mit B-Zellen kultiviert. T-Zellen wurden zur Proliferation angeregt (α CD3 + α CD28) und B-Zellen aktiviert (α IgA/G/M). T-Zell-Tochtergenerationen zeigen ein reduziertes CTV-Signal. Der Anteil der proliferierten Zellen an allen T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Stimulierte T-Zellen zeigten Proliferation (zweites Bild von links), diese wurde durch B-Zellen verstärkt (drittes Bild von links). Tef1 reduzierte den pro-proliferativen Effekt von B-Zellen (rechts Bild). Ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. **(B)** Statistische Auswertung der T-Zell-Proliferation ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test). Durch Stimulation proliferierten die T-Zellen, Tef1 verstärkte die Proliferation. B-Zellen verstärkten die Proliferation von T-Zellen. Der Effekt von B-Zellen auf die T-Zell-Proliferation war signifikant ($p < 0,001$). Tef1 reduzierte den proliferationsfördernden Effekt von B-Zellen, der Effekt war signifikant ($p < 0,001$). Weder das Candidaprotein Pra1 noch BSA inhibierten den proliferationsfördernden Effekt von B-Zellen. **(C)** Bestimmung von IL-2 in Kulturüberständen mittels ELISA. Durch Stimulation produzierten T-Zellen IL-2, Tef1 steigerte die Produktion nicht. B-Zellen erhöhten die Produktion von IL-2 signifikant ($n \geq 3$, zweiseitiger t-Test, $p < 0,001$). Tef1 inhibierte den B-Zell-abhängigen Effekt signifikant ($p < 0,001$), nicht so Pra1 und BSA.

5. Diskussion

Tef1 ist ein multifaktorielles Immunevasionsprotein von *C. albicans*. Als CRASP vermittelt Tef1 die Evasion der Komplementkaskade durch den Erreger und beeinflusst so die angeborene Immunreaktion auf *C. albicans*. Tef1 ist ein neuer, sezernierter Virulenzfaktor von *C. albicans*, der abseits der Pilzzelle auf B-Lymphozyten wirkt und deren Differenzierung moduliert. Auf diese Weise beeinflusst Tef1 auch die adaptive Immunreaktion auf *C. albicans*.

5.1. Tef1 ist ein CRASP und vermittelt die Komplementevasion von *Candida albicans*

Pathogene wie die Hefe *Candida albicans* verfügen über Mechanismen, um der Zerstörung durch das Komplementsystem zu entgehen und im menschlichen Organismus zu überdauern [76, 250]. *C. albicans* rekrutiert lösliche Komplementregulatoren an die Zelloberfläche des Pathogens [186, 195, 251] und wirkt so den Angriffen des Komplementsystems entgegen [25]. Die für die Rekrutierung der Komplementregulatoren verantwortlichen Proteine werden als CRASPs bezeichnet. Bislang sind vier CRASPs von *C. albicans* bekannt (Gpm1 [194], Gpd2 [198], Pra1 [195] und Hgt1p [199]). In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein Tef1 von *C. albicans* als neues CRASP identifiziert und in dieser Rolle charakterisiert.

Tef1 bindet Komplementregulatoren

Faktor H bindet an rekombinantes Tef1, die Dissoziationskonstante K_D beträgt 183 nmol/l. Tef1-gebundener Faktor H katalysiert die Spaltung und somit die Inaktivierung von C3b durch Faktor I. Alle bisher charakterisierten CRASPs von *C. albicans* binden Faktor H, den Hauptregulator des alternativen Wegs [22]. Tef1 bindet weiterhin die Komplementproteine FHL-1, CFHR1, C4BP und Properdin. Andere CRASPs von *C. albicans* binden ebenfalls humane Komplementregulatoren, insbesondere FHL-1 [194, 195, 198] und der Regulator des klassischen und Lektin-Wegs C4BP [196]. Für das Komplementevasionsprotein Scl1 (*streptococcal collagen-like protein 1*) von *S. pneumoniae* wurde die Bindung an CFHR1 gezeigt, ein Protein der Faktor H-Familie [252]. Die Rekrutierung des die C3-Konvertase des alternativen Wegs stabilisierenden Proteins Properdin (Faktor P) wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

Tef1 ist ein multivalentes Protein, welches die humanen Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1, CFHR1, C4BP und Properdin bindet. Es wurde untersucht, ob Tef1 die Aktivität dieser Regulatoren moduliert, indem es die Proteine bindet. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Tef1-gebundener Faktor H seine katalytische Aktivität für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b beibehält. Wenn Tef1-gebundene Komplementinhibitoren ihre regulatorischen Funktionen ausüben, tragen diese zur Immunevasion des Pathogens bei. Dies wurde für andere CRASPs von *C. albicans* beschrieben (Gpm1-FH/FHL-1 [194], Gpd2-FH/FHL-1 [198],

Pra1-FH/FHL-1 [195]; Pra1-C4BP [196]). Tef1 bindet zudem den Komplementaktivator Properdin. In diesem Fall ist es denkbar, dass Tef1 durch Bindung an Properdin dessen Funktion inhibiert, also der Stabilisierung der initialen C3-Konvertase des alternativen Wegs entgegenwirkt und somit die Aktivierung der Komplementkaskade auf der Pathogenoberfläche reduziert. Die prinzipielle Möglichkeit, die Aktivität von Properdin zu inhibieren, wurde beschrieben und resultierte in der verminderten Aktivierung der Komplementkaskade [253].

Tef1 wird an der Zelloberfläche exprimiert und aktiv sezerniert

Die bisher charakterisierten CRASPs von *C. albicans* sind Proteine, welche sowohl zytoplasmatisch als auch an der Zelloberfläche exprimiert werden und dort jeweils unterschiedliche Funktionen ausüben. Gemeinsame Funktion ist die Rekrutierung von Komplementregulatoren an die Zelloberfläche [194, 195, 198]. Zytoplasmatisches Tef1 ist ein Elongationsfaktor der fungalen Proteinsynthese. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Tef1 an der Oberfläche von *C. albicans* exprimiert wird. Hierbei ist die Expression auf Hyphen stärker als auf Hefezellen. Dies deckt sich mit der beschriebenen verstärkten Genexpression von *TEF1* in Hyphen innerhalb eines Infektionsmodells [247, 254]. Zudem wird hier bestätigt, dass Tef1 ein zytoplasmatisches Protein ist [254]. Sowohl auf der Zelloberfläche als auch zytoplasmatisch zeigt der *tef1Δ/Δ*-Stamm eine verminderte, jedoch nicht vollständig eliminierte Expression von Tef1. Bei dem detektierten Protein handelt es sich um das Genprodukt des *TEF2*-Gens, welches für das gleiche Protein codiert wie *TEF1*. *TEF2* trägt zu 50 % zur codierenden mRNA für das Protein Tef1 bei und wird gleichsam zu *TEF1* translatiert [243].

Die Fähigkeit von Proteinen, verschiedene Funktionen in zum Teil verschiedenen Entitäten ausüben zu können, wird als *moonlighting* bezeichnet, die betreffenden Proteine entsprechend als *moonlighting*-Proteine [255]. Tef1 ist ein solches *moonlighting*-Protein. Zytoplasmatisches Tef1 ist ein Elongationsfaktor der eukaryotischen Proteinsynthese. An der Zelloberfläche steht Tef1 im Verlauf einer Infektion im Kontakt mit Molekülen des Wirtsorganismus, wie etwa Komplementproteinen. Es stellt sich die Frage, ob auf der Oberfläche von *C. albicans* exprimiertes Tef1 gleichsam zu rekombinantem Tef1 Komplementregulatoren bindet und diese an die Zelloberfläche rekrutiert.

Die Lokalisierung von Tef1 an der Zelloberfläche von *C. albicans* warf die Frage auf, wie das Protein dorthin gelangt. Tef1 verfügt über kein Signalpeptid für eine Oberflächenlokalisierung oder Membranverankerung. Für das CRASP Pra1 wurde gezeigt, dass dieses Protein aktiv von *C. albicans* sezerniert wird [217] und in der Folge an die Zelloberfläche von *C. albicans* zurückbindet [195]. Dies stellt einen potentiellen Transportmechanismus zur Zelloberfläche dar. Daher wurde untersucht, ob auch Tef1 von *C. albicans* sezerniert wird und in der Folge an die Zelloberfläche bindet. Tef1 wird von *C. albicans* in den Kulturüberstand sezerniert. Die Freisetzung von Tef1 in Folge der Lyse der *C. albicans*-Zellen konnte ausgeschlossen werden. Die Zelllyse führt zur Freisetzung von β -actin in den Kulturüberstand, in den Überständen der

Candidakulturen wurde jedoch kein β -actin nachgewiesen. Die vollständige Abwesenheit von Tef1 in den Kulturüberständen des Knockout-Stammes *tef1 Δ /* Δ ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das verbliebene, von *TEF2* codierte Tef1 zur Aufrechterhaltung der Translation intrazellulär vorliegt. Lösliches Tef1 bindet an die Zelloberfläche von *C. albicans*. Somit kann von den Zellen sezerniertes Tef1 unmittelbar darauf an die Zelloberfläche binden. Dies stellt einen potentiellen Mechanismus für die Oberflächenlokalisierung dieses Proteins dar. Es ist denkbar, dass sezerniertes Tef1 spezifisch an ein Trägerprotein in der Zellwand von *C. albicans* bindet und auf diese Weise dort verankert wird. Dies entspricht dem für Pra1 postulierten Mechanismus [195]. Ferner legt die aktive Sezernierung von Tef1 die Möglichkeit nahe, dass das Protein Funktionen fernab der Candidazelle wahrnimmt, mit dem Immunsystem des Wirts interagiert und die Immunreaktion inhibiert. *C. albicans* exprimiert sezernierte Virulenzfaktoren. Hierbei handelt es sich jedoch – soweit bisher bekannt – ausschließlich um Proteasen, welche einerseits der Gewinnung von Nährstoffen und andererseits der Gewebsinvasion dienen [175, 187]. Weiterhin ist für das CRASP Pra1 bekannt, dass dieses in löslicher Form die Komplementkaskade inhibiert [213].

Tef1 rekrutiert Faktor H und Plasminogen an die Zelloberfläche von *C. albicans*

Nachdem gezeigt wurde, dass Tef1 ein Oberflächenprotein von *C. albicans* ist und außerdem Komplementregulatoren an rekombinantes Tef1 binden, wurde untersucht, ob Komplementregulatoren über Tef1 an *C. albicans* binden, Tef1 diese also an die Zelloberfläche rekrutiert. Auf diese Weise sollte Tef1 als CRASP identifiziert werden.

Die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen werden aus humanem Serum an die Zelloberfläche von *C. albicans* rekrutiert. Hierbei ist die Bindung an Zellen des Knockout-Stammes *tef1 Δ /* Δ geringer als an Zellen des Wildtyps und der Revertante *tef1 Δ /* Δ ::*TEF1*. Somit rekrutiert Tef1 die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen an die Zelloberfläche von *C. albicans*. Dies wird durch die Colokalisation von Faktor H mit Tef1 auf der Oberfläche von *C. albicans* bestätigt. Damit wurde Tef1 als neues CRASP von *C. albicans* identifiziert. Der Knockout-Stamm *tef1 Δ /* Δ zeigt sowohl für Faktor H als auch für Plasminogen eine Reduktion, aber keinen vollständigen Verlust der Bindungskapazität. Dies ist damit zu erklären, dass *C. albicans* über weitere CRASPs verfügt, welche Faktor H und Plasminogen binden [186, 194, 195, 198, 199]. Tef1 ist also nicht allein für die Rekrutierung von Komplementregulatoren an die Zelloberfläche von *C. albicans* verantwortlich, sondern agiert vielmehr als Teil eines mehrfach redundanten Systems, welches in der Summe die Komplementevasion des Pathogens vermittelt. Diese Redundanz ist ein Indiz für die Bedeutung des Komplementsystems für die Abwehr von Pilzinfektionen einerseits und die Wichtigkeit der Komplementevasion für das Pathogen andererseits.

Das oberflächenständige Protein Tef1 ist ein neues CRASP von *C. albicans*, denn es rekrutiert Komplementregulatoren an die Oberfläche der Hefe. Tef1-gebundene Komplementregulatoren sind aktiv (s.o.). Es sollte in der Folge untersucht werden, ob durch Tef1 rekrutierte Komplementregulatoren ihre regulatorischen Funktionen an der Zelloberfläche von *C. albicans* ausüben und so zur Immunevasion des Pilzes beitragen.

An die Zelloberfläche von *C. albicans* rekrutiertes Plasminogen schädigt Endothelzellen

Zum Zweck der Gewebsinvasion sezernieren Candidazellen Enzyme wie SAPs (*secreted aspartyl proteases*) und Lipasen, welche die Epithelzellen sowie die extrazelluläre Matrix schädigen [187, 188]. Es wurde gezeigt, dass Candidazellen Plasminogen an ihre Oberfläche binden, eine Beteiligung an der Gewebsinvasion konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden [186]. In der vorliegenden Studie wird erstmals gezeigt, dass an die Oberfläche von *C. albicans* rekrutiertes Plasminogen Endothelzellen schädigt. Dies legt nahe, dass Tef1 in seiner Funktion als Plasminogen-bindenden Oberflächenprotein eine Rolle für die Gewebsinvasion von *C. albicans* spielt.

Tef1-gebundene Komplementregulatoren inhibieren die Opsonisierung von *C. albicans* sowie die Phagozytose durch humane neutrophile Granulozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals für *C. albicans* gezeigt werden, dass ein einzelnes Oberflächenprotein in seiner Rolle als CRASP sowohl die Opsonisierung mit C3b als auch die Phagozytose der Zellen beeinflusst. Candidazellen des Knockout-Stammes *tef1Δ/Δ* werden verstärkt opsonisiert, während das im Wildtyp und der Revertante vorhandene Tef1 die Opsonisierung vermindert, indem es aktive Komplementregulatoren an die Zelloberfläche rekrutiert. Die Opsonisierung steht in Relation zur Phagozytose von *C. albicans* durch primäre humane neutrophile Granulozyten. Der Knockout-Stamm *tef1Δ/Δ* wird um ca. 35 % stärker opsonisiert (und in der Folge phagozytiert) als der Wildtyp und die Revertante. Dies ist – wie die o.g. reduzierte Rekrutierung von Komplementregulatoren – auf das Vorhandensein von mehreren CRASPs auf der Oberfläche von *C. albicans* zurückzuführen. Die über CRASPs an die Oberfläche von *C. albicans* gebundenen Komplementregulatoren inhibieren die Aktivierung der Komplementkaskade. Dies äußert sich z.B. in Form einer verminderten Deposition von C3b auf der Candidazelloberfläche [196, 199]. In Folge verminderter Opsonisierung ist auch die Phagozytose der Candidazellen reduziert [213]. Mit Tef1 wird in dieser Arbeit erstmals die direkte Rolle eines CRASPs von *C. albicans* für die Komplementevasion und die Evasion der Phagozytose des Erregers gezeigt. Tef1 ist Teil eines mehrfach redundanten Systems von CRASPs, welche die Komplement- und Immunevasion von *C. albicans* vermitteln. Die Redundanz dieser Immunevasionsmechanismen zeigt die Wichtigkeit der Komplementevasion für das Überleben des Pilzes und ist ein Indiz für die Bedeutung des Komplementsystems bei der Bekämpfung von Pilzinfektionen.

Tef1 vermittelt die Komplementevasion von *C. albicans*. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Tef1 ein CRASP von *C. albicans* ist und die Komplementregulatoren Faktor H und Plasminogen an die Oberfläche des Pilzes rekrutiert. Es wird erstmals für ein CRASP dessen direkter Einfluss auf die Komplement-vermittelte C3b-Deposition und der Zusammenhang mit der Phagozytose opsonisierter Candidazellen gezeigt. Tef1-exprimierende Candidazellen waren sowohl der Opsonisierung in Folge der Komplementaktivierung gegenüber geschützt als auch der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten (Abbildung 5.1).

5.2. Tef1 bindet an Raji-Zellen über den Komplementrezeptor 2

In der vorliegenden Arbeit wurde Tef1 als CRASP von *C. albicans* identifiziert. Tef1 ist ein Oberflächenprotein von *C. albicans* und rekrutiert Komplementregulatoren an die Zelloberfläche des Pathogens. Darüber hinaus wird Tef1 von *C. albicans* sezerniert. Es stellte sich die Frage, ob sezerniertes Tef1 noch weitere Rollen bei der Immunevasion von *C. albicans* spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass lösliches Tef1 mit Proteinen der Komplementkaskade interagiert und über den Komplementrezeptor 2 (CR2) an B-Zellen bindet.

Tef1 bindet C3dg und C3d und hat keinen Einfluss auf die Bindung von CR2 an C3d

Da CRASPs von *C. albicans* mit weiteren Komplementproteinen interagieren (Pra1-C3/C3b [196]), wurde untersucht, ob das CRASP Tef1 von *C. albicans* mit weiteren Komplementproteinen interagiert. Die Komplementproteine C3dg und C3d binden spezifisch an rekombinantes Tef1. Die Dissoziationskonstante K_D der Bindung von C3d an Tef1 beträgt 292 nmol/l. Das Vorläuferprotein C3b bindet nicht an Tef1. Es liegt nahe, dass im Zuge der Spaltung von C3b zu C3d eine Bindungsregion zugänglich wird, welche die Interaktion von Tef1 mit C3d vermittelt. Beim Abbau von C3b zu C3d wird eine zuvor maskierte Interaktionsregion freigelegt. Diese Domäne vermittelt die Interaktion von C3d mit CR2 [89], während C3b nicht mit CR2 interagiert [90]. Es ist denkbar, dass die Interaktion von Tef1 mit C3d durch ebendiese Region vermittelt wird und somit Tef1 und CR2 an dieselbe Region im C3d-Protein binden. Daher wurde untersucht, ob Tef1 die Bindung von CR2 an C3d beeinflusst. Die Interaktion von CR2 und C3d ist Bestandteil der Vernetzung des Komplementsystems mit dem adaptiven Immunsystem. Durch Bindung an CR2 verstärkt C3d das durch ein Antigen ausgelöste Aktivierungssignal in B-Zellen signifikant [3, 13, 91].

Pathogene verfügen über Proteine, welche ebendiese Vernetzung des Komplementsystems mit dem adaptiven Immunsystems angreifen und so die Immunreaktion inhibieren. Die Proteine EfbC und Sbi von *Staphylococcus aureus* binden an C3d und C3d, blockieren deren Bindung an CR2 [160, 161] und inhibieren so die Co-Aktivierung von B-Zellen [162]. Im Gegensatz zu EfbC bindet Tef1 neben C3d auch CR2 und inhibiert die Bindung von C3d an CR2 nicht.

Somit hat die Bindung von Tef1 an C3d keinen zu EfbC analogen Effekt. Vielmehr binden Tef1 und CR2 zeitgleich an C3d (Abbildung 4.9B). Damit wurde die vorherige Vermutung einer Konkurrenz von Tef1 und CR2 um die bei der Spaltung von C3b freigelegte Bindungsregion im C3d-Protein verworfen. CR2 und Tef1 konkurrieren nicht um die Bindung an C3d (Abbildung 4.9B). Tef1 bindet an CR2 innerhalb der SCRs 1-2. Innerhalb dieser SCRs liegt auch die Interaktionsregion von CR2 mit C3d (Abbildung 4.10 [256]). Tef1 beeinflusst die Bindung von C3d an CR2 nicht (Abbildung 4.9A) und ebenfalls nicht die Bindung von CR2 an C3d. Somit konkurrieren C3d und Tef1 nicht um die Bindung an CR2.

Tef1 bindet nicht nur C3d, sondern auch den Komplementrezeptor 2 (CR2) und inhibiert im Gegensatz zu EfbC die Protein-Protein-Interaktion von C3d und CR2 nicht. Einem funktionellen Effekt der Bindung von Tef1 an CR2 und C3d muss folglich ein anderer Wirkmechanismus zugrunde liegen als EfbC oder Sbi von *S. aureus*. Die Bindung von Tef1 an den Komplementrezeptor 2 (CR2) gibt Grund zu der Annahme, dass Tef1 über diesen Rezeptor mit Zellen interagiert.

Tef1 bindet an Raji-Zellen über den CR2-Rezeptor

Tef1 bindet *in vitro* an CR2. Es wurde untersucht, ob Tef1 *in vivo* mit CR2 auf B-Zellen interagiert. Tef1 bindet an die B-Zelllinie Raji. In Gegenwart von löslichem CR2 ist die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen reduziert. Löslicher CR2 besetzt die verantwortliche Bindungsdomäne von Tef1 und erlaubt so keine Bindung von Tef1 an membranständigen CR2. Dies zeigt, dass Tef1 über den Komplementrezeptor 2 an Raji-Zellen bindet. Jedoch wird die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen in Gegenwart von löslichem CR2 nicht vollständig aufgehoben, was auf die Existenz weiterer Rezeptoren für Tef1 auf der Oberfläche von Raji-Zellen hinweist.

Die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen über CR2 ist ein erster Hinweis, dass sezerniertes Tef1 abseits der Pilzzelle mit Immunzellen interagiert. CR2 wird auf B-Zellen exprimiert und vermittelt dort die Co-Aktivierung der Zellen [3, 257], die Aufnahme und Präsentation von Antigenen [94, 95] sowie die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses [258]. Durch Bindung an CR2 hat Tef1 also mannigfaltige Möglichkeiten, die B-Zell-vermittelte Immunreaktion zu modulieren. Daher wurde untersucht, ob Tef1 die Aktivierung von Raji-Zellen beeinflusst. Hierbei waren sowohl die Bindung von Tef1 an CR2 als auch an C3d von Interesse.

Die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors führt zur Phosphorylierung von CD19. Der Effekt ist dosis- und zeitabhängig. Die Vernetzung des B-Zell-Rezeptors und des Corezeptor-Komplexes auf B-Zellen senkt die Aktivierungsschwelle und verstärkt die Phosphorylierung von CD19 und Akt. Tef1 beeinflusst die Aktivierung der Raji-Zellen nicht. EfbC inhibiert die Vernetzung von BCR und Corezeptorkomplex, was sich in verminderter Phosphorylierung von CD19 und Akt niederschlägt. Dies bestätigt auf funktioneller Ebene, dass Tef1 anders als EfbC auf B-Zellen wirkt. Tef1 allein hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von CD19. Diese Daten bestä-

tigen auf zellulärer Ebene, dass einem Effekt von Tef1 auf Raji-Zellen ein anderer Mechanismus zugrunde liegen muss als der Wirkung von EfbC (s.o.). Unabhängig vom Corezeptorkomplex hat die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen keinen Einfluss auf deren Aktivierung.

Das CRASP Tef1 interagiert mit Proteinen des Komplementsystems. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Interaktion eines sezernierten CRASPs mit B-Zellen untersucht. Sezerniertes Tef1 bindet an Zellen der B-Zelllinie Raji über den Komplementrezeptor 2 (CR2). Tef1 vermittelt auf diese Weise möglicherweise immunevasive Mechanismen und moduliert die B-Zell-vermittelte Immunreaktion. Die Bindung von Tef1 an Raji-Zellen hat keinen funktionellen Effekt auf die Aktivierung von Raji-Zellen. Die Raji-Zelllinie ist in ihren Möglichkeiten zur Evaluierung der B-Zell-vermittelten Immunreaktion jedoch limitiert. Daher wurden zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Tef1 auf B-Zellen primäre humane Zellen verwendet.

5.3. Tef1 moduliert die Aktivierung von Immunzellen

Tef1 ist ein CRASP von *C. albicans* und wird sezerniert. Lösliches Tef1 bindet an Raji-Zellen über den Komplementrezeptor 2 (CR2). Tef1 hat keinen funktionellen Einfluss auf die Aktivierung von Raji-Zellen. Die Raji-Zelllinie ist jedoch in der Möglichkeit limitiert, funktionelle Effekte auf B-Zellen zu evaluieren. So ist es nicht möglich, in dieser immortalisierten Zelllinie gezielt die Zellproliferation und -differenzierung, sowie die Produktion von Zytokinen zu analysieren. Ferner werden einige Oberflächenrezeptoren wie z.B. der Komplementrezeptor 1 (CR1, CD35) auf Raji-Zellen nicht exprimiert [259]. Somit sind etwaige funktionelle Effekte der Bindung von Tef1 an CR2 oder andere Oberflächenrezeptoren in Raji-Zellen nicht messbar. Daher wurden funktionelle Effekte von Tef1 auf primäre humane B-Zellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Tef1 mit primären humanen B-Zellen interagiert und die Zytokinproduktion sowie die Differenzierung dieser Zellen moduliert.

Tef1 bindet an Zellen innerhalb von PBMCs und induziert die Produktion von IL-10

B-Zellen sind Teil eines komplexen Netzwerks aus Immunzellen, welche miteinander in Wechselwirkung stehen. Zunächst sollte der Effekt von Tef1 auf B-Zellen innerhalb dieses Netzwerks untersucht werden. Hierzu wurden PBMCs verwendet. PBMCs umfassen neben B- und T-Lymphozyten auch Monozyten. Tef1 bindet sowohl an CD19⁺ B- und CD4⁺ T-Lymphozyten als auch an CD14⁺ Monozyten innerhalb der PBMCs. Damit wurde die Bindung von Tef1 an B-Zellen bestätigt und zudem gezeigt, dass Tef1 auch mit weiteren Immunzellen in Wechselwirkung tritt. Tef1 bindet an Raji-Zellen über den Komplementrezeptor 2 (CR2), jedoch wird CR2 auf T-Zellen und Monozyten nicht exprimiert. Damit muss es noch weitere Rezeptoren für Tef1 geben, die auf T-Zellen oder Monozyten exprimiert sind. Auf Raji-Zellen existieren

weitere Rezeptoren für Tef1 (s.o.). Damit ist denkbar, dass es noch weitere Rezeptoren für Tef1 auf B-Zellen gibt. Deren Identifizierung steht noch aus.

Tef1 induziert die Produktion von Zytokinen in PBMCs. Tef1 allein induziert die Produktion von IL-10 und geringfügig von TNF- α , nicht aber von IFN- γ . Werden innerhalb der PBMCs gezielt B-Zellen (α lgM + α CD40) oder T-Zellen (α CD3) stimuliert, verstärkt Tef1 die Bildung von Zytokinen. Bei B-Zell-spezifischer Stimulation verstärkt Tef1 selektiv die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, während die Produktion von pro-inflammatorischem IFN- γ und TNF- α nicht beeinflusst wird. Somit moduliert Tef1 die Zytokinproduktion von B-Zellen und induziert ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil. Innerhalb der konzertierten Zytokinantwort nehmen B-Zellen eine besondere Rolle ein. Zum einen sind die Zellen auf costimulatorische Zytokine von T-Helferzellen angewiesen, welche ein elementares Signal zur Aktivierung der B-Zellen liefern (s.o. [3]). Zum anderen produzieren und sezernieren B-Zellen selbst Zytokine [111] und beeinflussen auf diese Weise wiederum T-Zellen und andere Immunzellen [115, 117]. B-Zellen produzieren nicht nur im Zusammenspiel mit T-Zellen Zytokine, sondern auch in Folge direkter Stimuli wie TLR-Agonisten [125]. Damit stellt sich die Frage, ob der Effekt von Tef1 auf die Zytokinproduktion von B-Zellen auf der direkten Interaktion von Tef1 mit B-Zellen beruht oder aber auf die Modulation der B-Zell-Zytokinproduktion durch Tef1-aktivierte T-Lymphozyten oder Monozyten zurückzuführen ist. Da Tef1 an B-Zellen bindet, liegt es nahe, dass Tef1 die Zytokinproduktion durch die direkte Wirkung auf die B-Zellen moduliert. Frühere Studien zeigten, dass die Aktivierung bestimmter Oberflächenrezeptoren die Zytokinproduktion von B-Zellen maßgeblich beeinflusst. Die alleinige Stimulation des B-Zell-Oberflächenrezeptors CD40 resultiert in einem anti-inflammatorischen Zytokinprofil, dominiert von IL-10, wohingegen die simultane Stimulation des BCRs ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil induziert [122]. *C. albicans* moduliert die durch TLRs ausgelöste Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen [260],[261] durch die selektive Aktivierung von TLR2 und verstärkt so die Produktion von IL-10 [215, 216]. Auch die Aktivierung des PRRs Dectin 1 durch β -Glucan von *C. albicans* induziert eine Zytokinantwort [262], darunter auch IL-10 [263]. Bisher wurde jedoch mit Ausnahme von CR2 kein Oberflächenrezeptor für Tef1 auf B-Zellen identifiziert. Somit sollte untersucht werden, ob Tef1 an weitere B-Zell-Oberflächenrezeptoren bindet, wie etwa CD40 oder PRRs, und so die Produktion von IL-10 in B-Zellen induziert.

Zusammengefasst bindet Tef1 an primäre humane Monozyten, B- und T-Lymphozyten. Tef1 moduliert die Zytokinproduktion in der heterogenen PBMC-Population und induziert bei B-Zell-spezifischer Stimulation ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil. Damit ist das *moonlighting*-Protein Tef1 das erste sezernierte CRASP von *C. albicans*, das eine immunmodulatorische Wirkung auf B-Zellen besitzt.

Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen und induziert die Differenzierung von B_{regs}

Tef1 bindet an B-Zellen innerhalb von PBMCs. Bei kurzzeitiger Stimulation der B-Zellen induziert Tef1 ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil. Neben dem kurzfristigen Effekt von Tef1 auf die Produktion von Zytokinen wurde auch der langfristige Effekt von Tef1 auf die Differenzierung von B-Zellen innerhalb der PBMCs untersucht. B-Zellen proliferieren nach ihrer Aktivierung und differenzieren zu Plasmazellen. Anstelle des membranständigen B-Zell-Rezeptor-Immunglobulins (IgM) werden nun große Mengen löslicher Immunglobuline (v.a. IgG) sezerniert. Weitere Oberflächenproteine werden nicht länger exprimiert (CD20), andere werden neu exprimiert (CD27, CD38). Durch die Stimulation mit PWM sowie den costimulatorischen Signalen von T-Zellen differenzieren naive B-Zellen (CD19⁺/CD27⁻/IgD⁺) zu Plasmablasten (CD19⁺/CD27⁺/IgD⁻).

Tef1 verstärkt innerhalb der PBMCs die Differenzierung von naiven B-Zellen (CD19⁺/CD27⁻/IgD⁺) zu Plasmablasten (CD19⁺/CD27⁺/IgD⁻). Tef1-induzierte Plasmablasten zeigen einen Phänotyp (CD24⁺/CD38⁺), welcher als charakteristisch für regulatorische B-Zellen beschrieben wurde [131, 132]. Die Tef1-induzierte Differenzierung geht einher mit einem anti-inflammatorischen Zytokinprofil: Die in Gegenwart von Tef1 differenzierten Zellen produzieren vermehrt IL-10, während die Produktion von TNF- α abnahm. Da Tef1 allein in PBMCs die Produktion von TNF- α nicht beeinflusst (Abbildung 4.14), ist es naheliegend, dass die verminderte TNF- α -Produktion ein Resultat der durch Tef1 modulierten B-Zell-Differenzierung ist. Die Produktion von IL-10 ist charakteristisch für regulatorische B-Zellen [120, 132, 135, 136], jedoch steht die Identifizierung der differenzierten B-Zellen als Quelle des produzierten IL-10 noch aus. Regulatorische B-Zellen inhibieren in der Folge z.B. die Differenzierung von Effektor-T-Zellen und dämpfen so die adaptive Immunantwort [131, 132, 143]. Die Induktion von B_{regs} und die damit verbundene Inhibition der Immunreaktion wurde als Immunevasionsmechanismus für andere Pathogene beschrieben (*Leishmania major* [163], Helminthen [164], HBV [142], HIV [165], *Salmonella typhimurium* [134]).

Zusammengefasst bindet Tef1 an B-Zellen innerhalb der PBMCs und moduliert die Immunreaktion der B-Zellen. Tef1 induziert kurzfristig ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil in B-Zellen. Langfristig induziert Tef1 innerhalb der PBMCs die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals für ein Protein von *C. albicans* gezeigt, dass dieses spezifisch mit B-Zellen interagiert und die Zytokinproduktion sowie die Differenzierung dieser Zellen moduliert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sezerniertes Tef1 innerhalb des Wirtsorganismus auch entfernt vom Infektionsort die Immunreaktion moduliert und die Immunreaktion zugunsten des Pathogens beeinflusst.

5.4. Tef1 induziert die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen

Tef1 bindet an primäre humane B-Zellen, beeinflusst deren Zytokinproduktion und induziert die Differenzierung von Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp. Die Effekte von Tef1 auf B-Zellen wurden experimentell innerhalb der heterogenen PBMC-Zellpopulation nachgewiesen. Zwar wurde gezeigt, dass Tef1 direkt an B-Zellen bindet, es besteht dennoch die Möglichkeit, dass der Einfluss von Tef1 auf die Zytokinproduktion und die Differenzierung von B-Zellen einem indirekten Mechanismus zugrunde liegt, wie etwa der Stimulation von B-Zellen durch von Tef1 aktivierte T-Zellen oder Monozyten. Daher wurde untersucht, ob Tef1 direkt auf B-Zellen wirkt und deren Zytokinproduktion und Differenzierung moduliert. Hierzu wurden gereinigte, primäre humane B-Zellen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Tef1 primäre humane B-Zellen direkt beeinflusst und die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen induziert.

Tef1 bindet an B-Zellen über CR2

Tef1 bindet an reine, aus PBMCs isolierte, primäre humane B-Zellen. Dies bestätigte die zuvor beobachtete Bindung von Tef1 an Raji-Zellen und B-Zellen innerhalb von PBMCs. Um die Bindung von Tef1 an primäre B-Zellen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Oberflächenproteine von B-Zellen auf ihre Interaktion mit Tef1 getestet. Tef1 bindet spezifisch an die B-Zell-Oberflächenproteine CD22, CR1 und CD40. In Gegenwart löslicher Oberflächenrezeptoren von B-Zellen wird die Bindung von Tef1 an B-Zellen nur im Fall von CR2₁₋₄ vermindert. Somit spielt von den hier untersuchten Interaktionspartnern von Tef1 nur dieser Rezeptor eine Rolle für die Bindung von Tef1 an B-Zellen. Dies bestätigt die Ergebnisse der Bindung von Tef1 an Raji-Zellen (s.o.).

Tef1 induziert die Produktion von IL-10, aber nicht von pro-inflammatorischem TNF- α

Tef1 induziert die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 in B-Zellen, nicht aber von pro-inflammatorischem TNF- α . Die Produktion von IL-10, nicht aber von TNF- α , wird in spezifisch stimulierten B-Zellen verstärkt. Damit werden die Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen in PBMCs bestätigt. Zudem wird hier gezeigt, dass das in Zellkulturüberständen detektierte IL-10 von B-Zellen selbst gebildet wird und innerhalb dieser Zellen nachgewiesen werden kann. Tef1 verstärkt die Bildung und damit das intrazelluläre Level von IL-10 in B-Zellen. Diese Daten bestätigen die vorherigen Beobachtungen: Tef1 induziert ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil in B-Zellen. Damit wird gezeigt, dass der zuvor in PBMCs beobachtete Effekt von Tef1 auf einer direkten Wirkung auf B-Zellen beruht.

Tef1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen

Tef1 bindet an primäre humane B-Zellen über CR2. Bei kurzzeitiger Stimulation induziert Tef1 die Produktion von IL-10 in B-Zellen. Das Zytokinmilieu beeinflusst maßgeblich die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen [264]. Daher wurde untersucht, ob Tef1 längerfristige

Effekte auf B-Zellen hat und deren Proliferation beeinflusste. Es wurde für andere Pathogene gezeigt, dass diese gezielt die B-Zell-Proliferation inhibieren (*Bacillus anthracis* [158], *Yersinia pseudotuberculosis* [159]). Tef1 beeinflusste die Proliferation von B-Zellen nicht. Die Aktivierung des B-Zell-Oberflächenrezeptors CR1 inhibierte die Proliferation. Dies wurde zuvor beschrieben [63]. Damit wird bestätigt, dass Tef1 nicht über CR1 an B-Zellen bindet und nicht als aktivierender Ligand von CR1 fungiert (s.o.).

Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen

Tef1 bindet an B-Zellen über CR2 und induziert die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 in diesen Zellen. Innerhalb von PBMCs verstärkt Tef1 die Differenzierung von naiven B-Zellen zu Plasmablasten. Allerdings birgt dieses komplexe System die Möglichkeit, dass die durch Tef1 ausgelöste verstärkte Differenzierung von B-Zellen (s.o.) nicht durch direkte Interaktion von Tef1 mit B-Zellen, sondern indirekt durch z.B. eine modulierte Costimulation von durch Tef1 beeinflussten T-Zellen hervorgerufen wurde. Daher wurden im nächsten Schritt untersucht, ob Tef1 die Differenzierung von reinen B-Zellen beeinflusst, also direkt auf B-Zellen wirkt. Tef1 verstärkt die Differenzierung der B-Zellen und es entstanden vermehrt Plasmablasten (IgD⁻/CD27⁺/CD38⁺). Der Effekt von Tef1 auf die Differenzierung von B-Zellen konnte somit auf eine direkte Interaktion von Tef1 mit B-Zellen zurückgeführt werden.

Die verstärkte Differenzierung zu Plasmablasten kann einen gezielten Immunevasionsmechanismus von *C. albicans* darstellen, wie er schon für andere Pathogene beschrieben wurde. Durch verstärkte Plasmablastendifferenzierung wird die Produktion niedrigaffiner Antikörper gefördert und die Effizienz der humoralen Immunantwort vermindert (*Trypanosoma cruzi* [153], *Plasmodium falciparum* [154], HCV [155], HIV [156], *Borrelia burgdorferi* [157]). Im Zuge der Tef1-induzierten verstärkten Differenzierung von Plasmablasten wird vermehrt IgG sezerniert. Ob die entstehenden Antikörper eine niedrigere Antigenaffinität aufweisen und es sich somit bei diesem Effekt von Tef1 um einen Immunevasionsmechanismus handelt, sollte im Tierexperiment validiert werden.

Weiterhin erhöht Tef1 den Anteil der IL-10⁺ B-Zellen während der B-Zell-Differenzierung. Die IL-10⁺ B-Zellen lagen vermehrt als CD27⁺/CD38⁺ Plasmablasten vor. Die durch Tef1 induzierte Bildung von Plasmablasten und IL-10⁺-Zellen korrelieren miteinander. Damit wurde gezeigt, dass Tef1 die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen induziert und diese vom Plasmablasten-Typ sind [133]. Tef1-induzierte B_{regs} sind zudem CD24⁺/CD38⁺ und entsprechen damit dem beschriebenen Phänotyp von regulatorischen B-Zellen. [131, 132].

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Induktion von regulatorischen B-Zellen durch *C. albicans* beschrieben. Ein solcher Mechanismus zur Inhibition der Immunreaktion des Wirts wurde bisher für bakterielle, virale und parasitäre Pathogene beschrieben (*Leishmania major* [163], Helminthen [164], HBV [142], HIV [165], *Salmonella typhimurium* [134]), ist jedoch für pathogene Pilze wie *C. albicans* bisher unbekannt.

Für keines der genannten Pathogene ist bekannt, welche Virulenzfaktoren die Induktion von regulatorischen B-Zellen vermitteln. Mit Tef1 wird in der vorliegenden Arbeit erstmals ein konkretes Pathogenmolekül identifiziert, das die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen induziert und so die adaptive Immunreaktion moduliert. Damit wird zum ersten Mal eine Verbindung zwischen einem Virulenzfaktor eines Pathogens und der Immunevasion des Erregers durch die Induktion von regulatorischen B-Zellen aufgezeigt.

Bisher *ex vivo* differenzierte und charakterisierte B_{regs} waren das Produkt gezielter Differenzierung von naiven B-Zellen mit Hilfe artifizierlicher Stimuli, wie αIgM, αCD40 oder dem TLR9-Liganden CpG. Die entstandenen Bregs produzieren anti-inflammatorische Zytokine, charakteristisch ist IL-10 [120, 121, 132, 135–137]. Die in dieser Arbeit beschriebenen, Tef1-induzierten B_{regs} entsprechen in dieser Hinsicht den zuvor gezielt differenzierten B_{regs}.

Durch die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder TGF-β verschieben B_{regs} das immunologische Gleichgewicht und beeinflussen die angeborene und adaptive Immunantwort z.B. durch die Verstärkung der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen, welche ihrerseits immunsuppressiv wirken [139, 141, 142] sowie der Inhibition der Proliferation und Differenzierung von Effektor-T-Zellen [131, 132, 143]. Es stellt sich die Frage, ob Tef1-induzierte regulatorische B-Zellen die o.g. Effekte vermitteln, also auf T-Zellen wirken und diese inhibieren. Daher wurde untersucht, ob Tef1-induzierte regulatorische B-Zellen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

Tef1-induzierte regulatorische B-Zellen inhibieren die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen

B-Zellen verstärken die Proliferation von CD4⁺ T-Helferzellen und Tef1 reduziert den proliferationsfördernden Effekt der B-Zellen. Damit wird auf funktioneller Ebene gezeigt, dass Tef1-induzierte B_{regs} einen regulatorischen Phänotyp besitzen und aktiv sind. Die Inhibition von T-Zellen durch B_{regs} wurde zuvor beschrieben [131, 132, 143]. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass ein Erregerprotein B_{regs} induziert und diese Zellen die Proliferation von T-Zellen inhibieren. Tef1 reduziert durch die Modulation der B-Zellen deren stimulierenden Einfluss auf T-Zellen und damit deren Kapazität zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Damit verschiebt Tef1 das Gleichgewicht des Immunsystems und inhibiert die Immunreaktion. Die Modulation der adaptiven Immunantwort ist ein bekannter Immunevasionsmechanismus von *C. albicans*. So wurde gezeigt, dass *C. albicans* die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen begünstigt [216], welche wiederum die Reaktion des Immunsystems während einer Infektion mit *C. albicans* inhibieren und so zur Persistenz des Erregers beitragen können [265]. Es ist denkbar, dass durch Tef1 induzierte regulatorische B-Zellen letztlich die Differenzierung von T-Zellen beeinflussen und somit die Vorstufe zu den von Netea et al. beschriebenen Effekten darstellen.

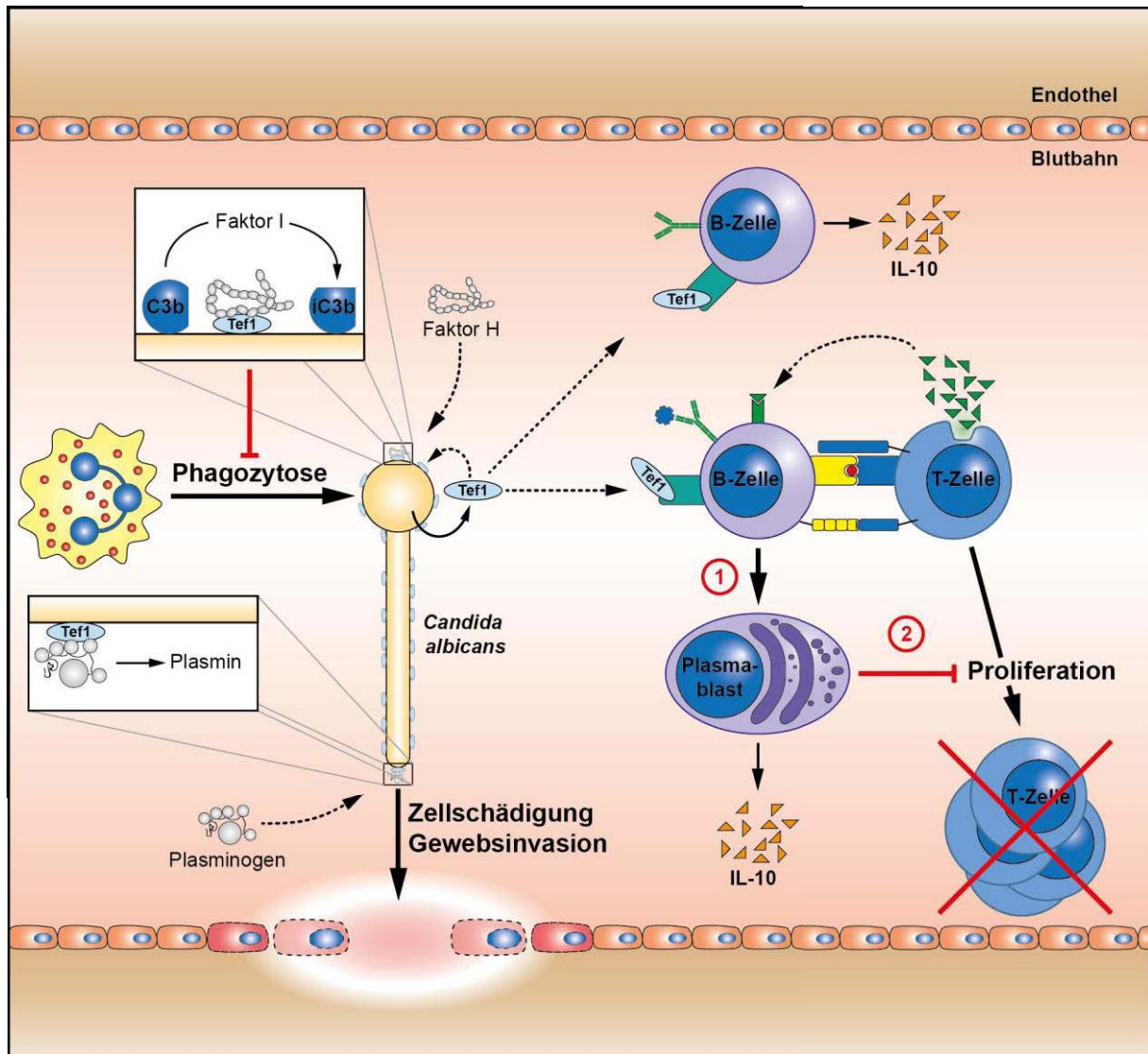


Abbildung 5.1: Zusammenfassung der immunevasiven Mechanismen von Tef1

Tef1 ist ein *moonlighting*-Protein von *Candida albicans*. An der Zelloberfläche fungiert Tef1 als CRASP. Durch die Rekrutierung von Komplementregulatoren an die Zelloberfläche von *C. albicans* trägt Tef1 zur Komplement- und damit zur Evasion der angeborenen Immunantwort bei. Die durch Tef1 rekrutierte Protease Plasmin schädigt Endothelzellen und trägt damit zur Gewebsinvasion von *C. albicans* bei. Tef1 wird sezerniert und lösliches Tef1 bindet abseits der Hefe an B-Zellen. Tef1 induziert die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 in B-Zellen und verstärkt die Differenzierung zu regulatorischen B-Zellen vom Plasmablasten-Typ (B_{regs}). B_{regs} inhibieren die T-Zell-vermittelte Immunreaktion.

Zusammengefasst bindet Tef1 an B-Zellen via CR2 und moduliert deren Funktionen. Kurzfristig induziert Tef1 die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10. Langfristig verstärkt Tef1 die Differenzierung von B-Zellen und induziert Plasmablasten mit regulatorischem Phänotyp, welche die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen inhibieren (Abbildung 5.1). Die Induktion regulatorischer B-Zellen durch Tef1 stellt einen neuartigen Immunevasionsmechanismus von *C. albicans* dar. Um diesen weiter zu charakterisieren, sollte in Zukunft untersucht werden, ob die von Tef1 induzierten B_{regs} weitere funktionelle Effekte auf andere Immunzellen, insbesondere

auf die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen haben. Weiterhin ist zu untersuchen, ob der hier beschriebene Effekt von rekombinantem Protein dem von *C. albicans* sezerniertem nativen Tef1 entspricht. Schließlich sollte die Funktion von Tef1 auf zellulärer Ebene in einem Infektionsmodell untersucht werden. Hierbei gälte es, die Effekte von Tef1 im Verbund der Immunevasionsmechanismen von *C. albicans* zu charakterisieren.

6. Literaturverzeichnis

1. ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell* (Garland Science, New York, 2002).
2. SEONG, S.-Y. & MATZINGER, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 469–478 (2004).
3. MURPHY, K. M., TRAVERS, P., WALPORT, M. & JANEWAY, C. A. *Janeway's Immunobiology Bd. 978,Nr. 0-4129* (Garland Science, New York, 2008).
4. ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. *Cellular and molecular immunology* (Saunders Elsevier, Philadelphia Pa., 2010).
5. ROITT, I., BROSTOFF, J. & MALE, D. *Immunology* (Mosby, Edinburgh, 2001).
6. MULLER-EBERHARD, H. J. The killer molecule of complement. *The Journal of investigative dermatology* **85**, 47 (1985).
7. TROUW, L. A., BLOM, A. M. & GASQUE, P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* **45**, 1199–1207 (2008).
8. KOLEV, M., LE FRIEC, G. & KEMPER, C. Complement–tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 811–820 (2014).
9. RICKLIN, D., HAJISHENGALLIS, G., YANG, K. & LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797 (2010).
10. KEMPER, C. & KOHL, J. Novel roles for complement receptors in T cell regulation and beyond. *Mol. Immunol.* **56**, 181–190 (2013).
11. MULLER-EBERHARD, H. J. Molecular organization and function of the complement system. *Annual review of biochemistry* **57**, 321–347 (1988).
12. PANGBURN, M. K., SCHREIBER, R. D. & MULLER-EBERHARD, H. J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *The Journal of Experimental Medicine* **154**, 856–867 (1981).
13. WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1058–1066 (2001).
14. FEARON, D. T. & AUSTEN, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of Experimental Medicine* **142**, 856–863 (1975).
15. SPITZER, D., MITCHELL, L. M., ATKINSON, J. P. & HOURCADE, D. E. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J. Immunol.* **179**, 2600–2608 (2007).
16. BORSOS, T. Immune complex mediated activation of the classical complement pathway. *Behring Institute Mitteilungen*, 93–101 (1989).
17. ALBERTÍ, S. *et al.* C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* **61**, 852–860 (1993).
18. KISHORE, U. & REID, K. B. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* **49**, 159–170 (2000).
19. WALLIS, R., MITCHELL, D. A., SCHMID, R., SCHWAEBLE, W. J. & KEEBLE, A. H. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* **215**, 1–11 (2010).
20. TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* **17**, 532–540 (1996).
21. CHEN, C.-B. & WALLIS, R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J. Biol. Chem.* **279**, 26058–26065 (2004).
22. HARBOE, M. & MOLLNES, T. E. The alternative complement pathway revisited. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**, 1074–1084 (2008).

23. ESSER, A. F. The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* **87**, 229–247 (1994).
24. PANGBURN, M. K., FERREIRA, V. P. & CORTES, C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine* **26 Suppl 8**, 21 (2008).
25. ZIPFEL, P. F. & SKERKA, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**, 729–740 (2009/10/print) <http://dx.doi.org/10.1038/nri2620>.
26. ESPARZA-GORDILLO, J. *et al.* Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* **56**, 77–82 (2004).
27. HAKOBYAN, S. *et al.* Measurement of factor H variants in plasma using variant-specific monoclonal antibodies: application to assessing risk of age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **49**, 1983–1990 (2008).
28. RIPOCHE, J., DAY, A. J., HARRIS, T. J. R. & SIM, R. B. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem. J.* **249**, 593–602 (1988).
29. WEILER, J. M., DAHA, M. R., AUSTEN, K. F. & FEARON, D. T. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3268–3272 (1976).
30. WHALEY, K. & RUDDY, S. Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science (New York, N.Y.)* **193**, 1011–1013 (1976).
31. PANGBURN, M. K., SCHREIBER, R. D. & MULLER-EBERHARD, H. J. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *The Journal of Experimental Medicine* **146**, 257–270 (1977).
32. KUHN, S., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J. Immunol.* **155**, 5663–5670 (1995).
33. SHARMA, A. K. & PANGBURN, M. K. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10996–11001 (1996).
34. JÓZSI, M. & ZIPFEL, P. F. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol.* **29**, 380–387 (2008).
35. OPPERMAN, M. *et al.* The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clinical and Experimental Immunology* **144**, 342–352 (2006).
36. ZIPFEL, P. F. & SKERKA, C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol. Today* **20**, 135–140 (1999).
37. KUHN, S. & ZIPFEL, P. F. Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2383–2387 (1996).
38. HELLWAGE, J., KUHN, S. & ZIPFEL, P. F. The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *The Biochemical journal* **326 (Pt 2)**, 321–327 (1997).
39. SKERKA, C., HORSTMANN, R. D. & ZIPFEL, P. F. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J. Biol. Chem.* **266**, 12015–12020 (1991).
40. PARK, C. T. & WRIGHT, S. D. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 18054–18060 (1996).
41. HEINEN, S. *et al.* Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* **114**, 2439–2447 (2009).

42. SKERKA, C., CHEN, Q., FREMEAUX-BACCHI, V. & ROUMENINA, L. T. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol. Immunol.* **56**, 170–180 (2013).
43. GOICOECHEA DE JORGE, E. *et al.* Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 4685–4690 (2013).
44. MARTIN, M. *et al.* Complement activation and plasma levels of C4b-binding protein in critical limb ischemia patients. *Journal of vascular surgery* **50**, 100–106 (2009).
45. SCHARFSTEIN, J. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *Journal of Experimental Medicine* **148**, 207–222 (1978).
46. GIGLI, I., FUJITA, T. & NUSSENZWEIG, V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 6596–6600 (1979).
47. MIYASHITA, C., WENZEL, E. & HEIDEN, M. Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis* **18 Suppl 1**, 7–13 (1988).
48. CESARMAN-MAUS, G. & HAJJAR, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology* **129**, 307–321 (2005).
49. LAHTENMAKI, K., EDELMAN, S. & KORHONEN, T. K. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends in microbiology* **13**, 79–85 (2005).
50. LAHTENMAKI, K., KUUSELA, P. & KORHONEN, T. K. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods (San Diego, Calif.)* **21**, 125–132 (2000).
51. BREZSKI, R. J. & JORDAN, R. E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? *mAbs* **2**, 212–220 (2010).
52. BARTHEL, D., SCHINDLER, S. & ZIPFEL, P. F. Plasminogen Is a Complement Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18831–18842 (2012).
53. PILLEMER, L., RATNOFF, O. D., BLUM, L. & LEPOW, I. H. The inactivation of complement and its components by plasmin. *The Journal of Experimental Medicine* **97**, 573–589 (1953).
54. FEARON, D. T. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *The Journal of Experimental Medicine* **152**, 20–30 (1980).
55. DANIELSSON, C., PASCUAL, M., FRENCH, L., STEIGER, G. & SCHIFFERLI, J. A. Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2725–2731 (1994).
56. FEARON, D. T. Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine* **153**, 1615–1628 (1981).
57. ABRAHAMSON, D. R. & FEARON, D. T. Endocytosis of the C3b receptor of complement within coated pits in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **48**, 162–168 (1983).
58. IIDA, K. Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *Journal of Experimental Medicine* **153**, 1138–1150 (1981).
59. KRYCH-GOLDBERG, M., HAUHART, R. E., PORZUKOWIAK, T. & ATKINSON, J. P. Synergy between two active sites of human complement receptor type 1 (CD35) in complement regulation: implications for the structure of the classical pathway C3 convertase and generation of more potent inhibitors. *J. Immunol.* **175**, 4528–4535 (2005).

60. ROSS, G. D., LAMBRIS, J. D., CAIN, J. A. & NEWMAN, S. L. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J. Immunol.* **129**, 2051–2060 (1982).
61. MEDOF, M. E. Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *Journal of Experimental Medicine* **159**, 1669–1685 (1984).
62. KHERA, R. & DAS, N. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol. Immunol.* **46**, 761–772 (2009).
63. JÓZSI, M., PRECHL, J., BAJTAY, Z. & ERDEI, A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *J. Immunol.* **168**, 2782–2788 (2002).
64. KREMLITZKA, M. *et al.* Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients. *Int. Immunol.* **25**, 25–33 (2013).
65. WAGNER, C. *et al.* The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. *Mol. Immunol.* **43**, 643–651 (2006).
66. PREISSNER, K. T. Structure and biological role of vitronectin. *Annual review of cell biology* **7**, 275–310 (1991).
67. HOURCADE, D. E. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Current drug targets* **9**, 158–164 (2008).
68. ZICCARDI, R. J. The first component of human complement (C1): activation and control. *Springer seminars in immunopathology* **6**, 213–230 (1983).
69. SKIDGEL, R. A. & ERDOS, E. G. Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *International immunopharmacology* **7**, 1888–1899 (2007).
70. TSCHOPP, J., CHONN, A., HERTIG, S. & FRENCH, L. E. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J. Immunol.* **151**, 2159–2165 (1993).
71. KIM, D. D. & SONG, W.-C. Membrane complement regulatory proteins. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **118**, 127–136 (2006).
72. SEYA, T. & ATKINSON, J. P. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *The Biochemical journal* **264**, 581–588 (1989).
73. MERI, S. *et al.* Human protectin (CD59), an 18,000–20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* **71**, 1–9 (1990).
74. NAGLIK, J. R. Candida Immunity. *New Journal of Science* **2014**, 1–27 (2014).
75. JOINER, K., BROWN, E., HAMMER, C., WARREN, K. & FRANK, M. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. *J. Immunol.* **130**, 845–849 (1983).
76. LAMBRIS, J. D., RICKLIN, D. & GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 132–142 (2008).
77. COLE, D. S. & MORGAN, B. P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clinical science (London, England : 1979)* **104**, 455–466 (2003).
78. HAAS, P.-J. & VAN STRIJP, J. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunologic research* **37**, 161–175 (2007).
79. FISCHER, W. H. & HUGLI, T. E. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF- α , IL-6, and the polyclonal immune response. *J. Immunol.* **159**, 4279–4286 (1997).
80. NORDAHL, E. A. *et al.* Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 16879–16884 (2004).

81. VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M., WIESMANN, C. & BROWN, E. J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* **9**, 2095–2102 (2007).
82. HELMY, K. Y. *et al.* CRlg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* **124**, 915–927 (2006).
83. ZHOU, W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology* **217**, 225–234 (2012).
84. STRAINIC, M. G. *et al.* Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity* **28**, 425–435 (2008).
85. STRAINIC, M. G., SHEVACH, E. M., AN, F., LIN, F. & MEDOF, M. E. Absence of signaling into CD4⁺ cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF- β 1 signaling and induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 162–171 (2013).
86. GHANNAM, A., FAUQUERT, J.-L., THOMAS, C., KEMPER, C. & DROUET, C. Human complement C3 deficiency: Th1 induction requires T cell-derived complement C3a and CD46 activation. *Mol. Immunol.* **58**, 98–107 (2014).
87. CARDONE, J. *et al.* Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 862–871 (2010).
88. LE FRIEC, G. *et al.* The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat. Immunol.* **13**, 1213–1221 (2012).
89. GROS, P., MILDER, F. J. & JANSSEN, B. J. C. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* **8**, 48–58 (2008/01//print) <http://dx.doi.org/10.1038/nri2231>.
90. AHEARN, J. M. & FEARON, D. T. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Advances in immunology* **46**, 183–219 (1989).
91. CARTER, R. H. & FEARON, D. T. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 105–107 (1992).
92. DEMPSEY, P. W., ALLISON, M. E., AKKARAJU, S., GOODNOW, C. C. & FEARON, D. T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**, 348–350 (1996).
93. BARRINGTON, R. A. *et al.* CD21/CD19 coreceptor signaling promotes B cell survival during primary immune responses. *J. Immunol.* **175**, 2859–2867 (2005).
94. HESS, M. W. *et al.* Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21). *Blood* **95**, 2617–2623 (2000) <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/95/8/2617.full.pdf>.
95. CHERUKURI, A., CHENG, P. C. & PIERCE, S. K. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J. Immunol.* **167**, 163–172 (2001).
96. CARROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 981–986 (2004).
97. CARROLL, M. C. Complement and humoral immunity. *Vaccine* **26 Suppl 8**, 33 (2008).
98. FANG, Y., XU, C., FU, Y. X., HOLERS, V. M. & MOLINA, H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J. Immunol.* **160**, 5273–5279 (1998).
99. OTTONELLO, L. *et al.* rC5a Directs the In Vitro Migration of Human Memory and Naive Tonsillar B Lymphocytes: Implications for B Cell Trafficking in Secondary Lymphoid Tissues. *J. Immunol.* **162**, 6510–6517 (1999).
100. SHUSHAKOVA, N. *et al.* C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory Fc γ R_s in immune complex-induced lung disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 1823–1830 (2002).

101. ARMITAGE, R. J. *et al.* Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**, 80–82 (1992).
102. MALISZEWSKI, C. R. *et al.* Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1044–1049 (1993).
103. HODGKIN, P. D., FEI GO, N., CUPP, J. E. & HOWARD, M. Interleukin-4 enhances anti-IgM stimulation of B cells by improving cell viability and by increasing the sensitivity of b cells to the anti-IgM signal. *Cellular Immunology* **134**, 14–30 (1991).
104. RUSH, J. S. & HODGKIN, P. D. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1150–1159 (2001).
105. RADBRUCH, A. *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews. Immunology* **6**, 741–750 (2006).
106. BUDEUS, B. *et al.* Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E5281-9 (2015).
107. NIRO, H. & CLARK, E. A. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 945–956 (2002).
108. CARROLL, M. C. & ISENMAN, D. E. Regulation of Humoral Immunity by Complement. *Immunity* **37**, 199–207 (24 August 2012) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761312003287>.
109. LANZAVECCHIA, A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annual review of immunology* **8**, 773–793 (1990).
110. MALYNN, B. A., ROMEO, D. T. & WORTIS, H. H. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. *J. Immunol.* **135**, 980–988 (1985).
111. PISTOIA, V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunology Today* **18**, 343–350 (1997).
112. GHADIALLY, H. *et al.* Differential Regulation of CCL22 Gene Expression in Murine Dendritic Cells and B Cells. *J. Immunol.* **174**, 5620–5629 (2005).
113. NAKAYAMA, T. *et al.* Selective Induction of Th2-Attracting Chemokines CCL17 and CCL22 in Human B Cells by Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology* **78**, 1665–1674 (2004).
114. LUTHER, S. A., LOPEZ, T., BAI, W., HANAHAN, D. & CYSTER, J. G. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* **12**, 471–481 (2000).
115. HARRIS, D. P. *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 475–482 (2000).
116. SPELLBERG, B. & EDWARDS, J. E., JR. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 76–102 (2001).
117. SCHULTZE, J. L. *et al.* Human Non-Germinal Center B Cell Interleukin (IL)-12 Production Is Primarily Regulated by T Cell Signals CD40 Ligand, Interferon γ , and IL-10. Role of B Cells in the Maintenance of T Cell Responses. *J Exp Med* **189**, 1–12 (1999).
118. LUND, F. E. & RANDALL, T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 236–247 (2010).

119. MIZOGUCHI, A. & BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. *J. Immunol.* **176**, 705–710 (2006).
120. IWATA, Y. *et al.* Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530–541 (2011).
121. SHEN, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366–370 (2014).
122. DUDDY, M. E., ALTER, A. & BAR-OR, A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol.* **172**, 3422–3427 (2004).
123. LUND, F. E., GARVY, B. A., RANDALL, T. D. & HARRIS, D. P. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Current directions in autoimmunity* **8**, 25–54 (2005).
124. LAMPROPOULOU, V. *et al.* TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* **180**, 4763–4773 (2008).
125. AGRAWAL, S. & GUPTA, S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *Journal of clinical immunology* **31**, 89–98 (2011).
126. DECKER, T. *et al.* Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **95**, 999–1006 (2000).
127. WAGNER, M. *et al.* IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J. Immunol.* **172**, 954–963 (2004).
128. MONTAGNOLI, C. *et al.* A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1193–1204 (2003).
129. ROSSER, E. C. & MAURI, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607–612 (2015).
130. VAN DE VEEN, W. *et al.* IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* **131**, 1204–1212 (2013).
131. BLAIR, P. A. *et al.* CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **32**, 129–140 (2010).
132. FLORES-BORJA, F. *et al.* CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* **5**, 173 (2013).
133. FILLATREAU, S. Regulatory plasma cells. *Current opinion in pharmacology* **23**, 1–5 (2015).
134. NEVES, P. *et al.* Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* **33**, 777–790 (2010).
135. MATSUMOTO, M. *et al.* Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* **41**, 1040–1051 (2014).
136. MATSUSHITA, T. & TEDDER, T. F. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **677**, 99–111 (2011).
137. TIAN, J. *et al.* Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate Th1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* **167**, 1081–1089 (2001).
138. BERTHELOT, J.-M. *et al.* Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* **80**, 18–22 (2013).

139. CARTER, N. A. *et al.* Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol.* **186**, 5569–5579 (2011).
140. KESSEL, A. *et al.* Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Auto-immunity reviews* **11**, 670–677 (2012).
141. NOUEL, A. *et al.* B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney international* **85**, 590–599 (2014).
142. LIU, Y. *et al.* IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clinical science (London, England : 1979)* **130**, 907–919 (2016).
143. BOUAZIZ, J.-D. *et al.* IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2686–2691 (2010).
144. LO-MAN, R. Regulatory B cells control dendritic cell functions. *Immunotherapy* **3**, 19–20 (2011).
145. KLINKER, M. W. & LUNDY, S. K. Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **18**, 123–137 (2012).
146. POE, J. C. *et al.* Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice. *PLoS One* **6**, e22464 (2011).
147. KUPPERS, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 801–812 (2003).
148. HELD, W. *et al.* Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell* **74**, 529–540 (1993).
149. GOENKA, R., GUIRNALDA, P. D., BLACK, S. J. & BALDWIN, C. L. B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.* **206**, 91–98 (2012).
150. ROSALES-REYES, R. *et al.* Salmonella infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microbial pathogenesis* **52**, 367–374 (2012).
151. HATTON, O. *et al.* Syk activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt prevents HtrA2-dependent loss of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) to promote survival of Epstein-Barr virus+ (EBV+) B cell lymphomas. *J. Biol. Chem.* **286**, 37368–37378 (2011).
152. PEREZ-LOPEZ, A., ROSALES-REYES, R., ALPUCHE-ARANDA, C. M. & ORTIZ-NAVARRETE, V. Salmonella downregulates Nod-like receptor family CARD domain containing protein 4 expression to promote its survival in B cells by preventing inflammasome activation and cell death. *J. Immunol.* **190**, 1201–1209 (2013).
153. BERMEJO, D. A. *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* **132**, 123–133 (2011).
154. SIMONE, O. *et al.* TLRs innate immunoreceptors and Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) CIDR1alpha-driven human polyclonal B-cell activation. *Acta tropica* **119**, 144–150 (2011).
155. ROSA, D. *et al.* Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18544–18549 (2005).

156. PERISE-BARRIOS, A. J., MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. & PION, M. Direct phenotypical and functional dysregulation of primary human B cells by human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in vitro. *PLoS One* **7**, e39472 (2012).
157. HASTEY, C. J., ELSNER, R. A., BARTHOLD, S. W. & BAUMGARTH, N. Delays and diversions mark the development of B cell responses to *Borrelia burgdorferi* infection. *J. Immunol.* **188**, 5612–5622 (2012).
158. FANG, H., XU, L., CHEN, T. Y., CYR, J. M. & FRUCHT, D. M. Anthrax lethal toxin has direct and potent inhibitory effects on B cell proliferation and immunoglobulin production. *J. Immunol.* **176**, 6155–6161 (2006).
159. YAO, T., MECSAS, J., HEALY, J. I., FALKOW, S. & CHIEN, Y.-H. Suppression of T and B Lymphocyte Activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Factor, YopH. *The Journal of Experimental Medicine* **190**, 1343–1350 (1999).
160. BURMAN, J. D. *et al.* Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **283**, 17579–17593 (2008).
161. HAMMEL, M. *et al.* A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat. Immunol.* **8**, 430–437 (2007).
162. RICKLIN, D., RICKLIN-LICHTSTEINER, S. K., MARKIEWSKI, M. M., GEISBRECHT, B. V. & LAMBRIS, J. D. Cutting Edge: Members of the *Staphylococcus aureus* Extracellular Fibrinogen-Binding Protein Family Inhibit the Interaction of C3d with Complement Receptor 2. *J. Immunol.* **181**, 7463–7467 (2008).
163. RONET, C. *et al.* Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J. Immunol.* **184**, 886–894 (2010).
164. AMU, S. *et al.* Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *The Journal of allergy and clinical immunology* **125**, 1114 (2010).
165. LIU, J. *et al.* IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PLoS One* **9**, e89236 (2014).
166. DOUGAN, S. K. *et al.* Antigen-specific B-cell receptor sensitizes B cells to infection by influenza virus. *Nature* **503**, 406–409 (2013).
167. MENON, A., SHROYER, M. L., WAMPLER, J. L., CHAWAN, C. B. & BHUNIA, A. K. In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **26**, 157–174 (2003).
168. NOTHELFER, K. *et al.* B lymphocytes undergo TLR2-dependent apoptosis upon *Shigella* infection. *The Journal of Experimental Medicine* **211**, 1215–1229 (2014).
169. ZUÑIGA, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clinical and Experimental Immunology* **119**, 507–515 (1999).
170. ILIEV, I. D. & UNDERHILL, D. M. Striking a balance: fungal commensalism versus pathogenesis. *Current opinion in microbiology* **16**, 366–373 (2013).
171. NAGLIK, J. R., FIDEL, P. L., JR & ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiology Letters* **283**, 129–139 (2008).
172. HONG NGUYEN, M. *et al.* The changing face of candidemia. Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *The American Journal of Medicine* **100**, 617–623 (1996).
173. FORD, C. B. *et al.* The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife* **4**, e00662 (2015).

174. ALONSO-VALLE, H. *et al.* Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **22**, 254–257 (2003).
175. MEYER, E., GEFFERS, C., GASTMEIER, P. & SCHWAB, F. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill.* **18** (2013).
176. GOW, N. A. R., VAN DE VEERDONK, F. L., BROWN, A. J. P. & NETEA, M. G. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Micro* **10**, 112–122 (2012/02/print) <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2711>.
177. NETEA, M. G., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J. & GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 67–78 (2008).
178. GOW, N. A. R., BROWN, A. J. P. & ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current opinion in microbiology* **5**, 366–371 (2002).
179. SUNDSTROM, P. Adhesins in Candida albicans. *Current opinion in microbiology* **2**, 353–357 (1999).
180. LO, H. J. *et al.* Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939–949 (1997).
181. DALLE, F. *et al.* Cellular interactions of Candida albicans with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell. Microbiol.* **12**, 248–271 (2010).
182. JACOBSEN, I. D. *et al.* Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. *Expert review of anti-infective therapy* **10**, 85–93 (2012).
183. WACHTLER, B., WILSON, D., HAEDICKE, K., DALLE, F. & HUBE, B. From attachment to damage: defined genes of Candida albicans mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* **6**, e17046 (2011).
184. SHEPPARD, D. C. & FILLER, S. G. Host cell invasion by medically important fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **5**, a019687 (2015).
185. FILLER, S. G. & SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathogens* **2**, e129 (2006).
186. CROWE, J. D. *et al.* Candida albicans binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **47**, 1637–1651 (2003).
187. NAGLIK, J. R., CHALLACOMBE, S. J. & HUBE, B. Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 400–428 (2003).
188. SCHALLER, M., BORELLI, C., KORTING, H. C. & HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. *Mycoses* **48**, 365–377 (2005).
189. PARK, H. *et al.* Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell. Microbiol.* **7**, 499–510 (2005).
190. CHAI, L. Y. A., NETEA, M. G., VONK, A. G. & KULLBERG, B.-J. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Medical mycology* **47**, 227–236 (2009).
191. NADIR, E. & KAUFSTEIN, M. Images in clinical medicine. Candida albicans in a peripheral-blood smear. *N. Engl. J. Med.* **353**, e9 (2005).
192. DONGARI-BAGTZOGLU, A., KASHLEVA, H., DWIVEDI, P., DIAZ, P. & VASILAKOS, J. Characterization of mucosal Candida albicans biofilms. *PLoS One* **4**, e7967 (2009).
193. DOUGLAS, L. J. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology* **11**, 30–36 (2003).
194. POLTERMANN, S. *et al.* Gpm1p Is a Factor H-, FHL-1-, and Plasminogen-binding Surface Protein of Candida albicans. *J. Biol. Chem.* **282**, 37537–37544 (2007).

195. LUO, S., POLTERMANN, S., KUNERT, A., RUPP, S. & ZIPFEL, P. F. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol. Immunol.* **47**, 541–550 (2009/12) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900900618X>.
196. LUO, S. *et al.* The pH-regulated Antigen 1 of *Candida albicans* Binds the Human Complement Inhibitor C4b-binding Protein and Mediates Fungal Complement Evasion. *J. Biol. Chem.* **286**, 8021–8029 (2011).
197. ZIPFEL, P. F., SKERKA, C., KUPKA, D. & LUO, S. Immune escape of the human facultative pathogenic yeast *Candida albicans*: The many faces of the *Candida* Pra1 protein. Colonisation and infection by human-pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 423–430 (2011/6) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422111000270>.
198. LUO, S., HOFFMANN, R., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 is a novel factor H-, factor H-like protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* **207**, 594–603 (2013).
199. LESIAK-MARKOWICZ, I. *et al.* *Candida albicans* Hgt1p, a Multifunctional Evasion Molecule: Complement Inhibitor, CR3 Analogue, and Human Immunodeficiency Virus-Binding Molecule. *J. Infect. Dis.* **204**, 802–809 (2011).
200. LUO, S., SKERKA, C., KURZAI, O. & ZIPFEL, P. F. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. 14th European Meeting on Complement in Human Disease, Jena, August 17-21, 2013. *Mol. Immunol.* **56**, 161–169 (15 December 2013) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589013003866>.
201. KRAICZY, P. & WURZNER, R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol. Immunol.* **43**, 31–44 (2006).
202. AGARWAL, V. *et al.* Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 23486–23495 (2010).
203. HAMMERSCHMIDT, S. *et al.* The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J. Immunol.* **178**, 5848–5858 (2007).
204. KRAICZY, P., SKERKA, C., KIRSCHFINK, M., BRADE, V. & ZIPFEL, P. F. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1674–1684 (2001).
205. BERNET, J., MULLICK, J., SINGH, A. K. & SAHU, A. Viral mimicry of the complement system. *Journal of biosciences* **28**, 249–264 (2003).
206. MERI, T. *et al.* *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. *J. Infect. Dis.* **185**, 1786–1793 (2002).
207. INAL, J. M. Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. *Trends in parasitology* **20**, 407–412 (2004).
208. MERI, T. *et al.* The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect. Immun.* **70**, 5185–5192 (2002).
209. BEHNSEN, J. *et al.* The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect. Immun.* **76**, 820–827 (2008).
210. SPREGHINI, E., GISMONDI, A., PICCOLI, M. & SANTONI, G. Evidence for alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin-like vitronectin (VN) receptors in *Candida albicans* and their involvement in yeast cell adhesion to VN. *J. Infect. Dis.* **180**, 156–166 (1999).
211. JAKAB, E., PAULSSON, M., ASCENCIO, F. & LJUNGH, A. Expression of vitronectin and fibronectin binding by *Candida albicans* yeast cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **101**, 187–193 (1993).

212. GROPP, K. *et al.* The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol. Immunol.* **47**, 465–475 (2009/12) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589009006932>.
213. LUO, S., HARTMANN, A., DAHSE, H.-M., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. Secreted pH-Regulated Antigen 1 of *Candida albicans* Blocks Activation and Conversion of Complement C3. *J. Immunol.* **185**, 2164–2173 (2010).
214. GANTNER, B. N., SIMMONS, R. M. & UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO journal* **24**, 1277–1286 (2005).
215. Van der Graaf, Chantal A A, NETEA, M. G., VERSCHUEREN, I., Van der Meer, Jos W M & KULLBERG, B. J. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect. Immun.* **73**, 7458–7464 (2005).
216. NETEA, M. G. *et al.* Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**, 3712–3718 (2004).
217. SOLOVIEV, D. A. *et al.* Identification of pH-Regulated Antigen 1 Released from *Candida albicans* as the Major Ligand for Leukocyte Integrin $\alpha M\beta 2$. *J. Immunol.* **178**, 2038–2046 (2007).
218. LORENZ, M. C., BENDER, J. A. & FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic cell* **3**, 1076–1087 (2004).
219. ULLMANN, B. D. *et al.* Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **3**, 715–723 (2004).
220. MONGA, D. P., KUMAR, R., MOHAPATRA, L. N. & MALAVIYA, A. N. Experimental cryptococcosis in normal and B-cell-deficient mice. *Infect. Immun.* **26**, 1–3 (1979).
221. CARROW, E. W., HECTOR, R. F. & DOMER, J. E. Immunodeficient CBA/N mice respond effectively to *Candida albicans*. *Clinical immunology and immunopathology* **33**, 371–380 (1984).
222. CASADEVALL, A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.* **63**, 4211–4218 (1995).
223. MATTHEWS, R. & BURNIE, J. Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* **2**, 472–476 (2001).
224. SAVILLE, S. P., LAZZELL, A. L., CHATURVEDI, A. K., MONTEAGUDO, C. & LOPEZ-RIBOT, J. L. Use of a genetically engineered strain to evaluate the pathogenic potential of yeast cell and filamentous forms during *Candida albicans* systemic infection in immunodeficient mice. *Infect. Immun.* **76**, 97–102 (2008).
225. VERMA, A., WUTHRICH, M., DEEPE, G. & KLEIN, B. Adaptive immunity to fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **5**, a019612 (2015).
226. TOROSANTUCCI, A. *et al.* A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *The Journal of Experimental Medicine* **202**, 597–606 (2005).
227. BRENA, S. *et al.* Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect. Immun.* **75**, 3680–3682 (2007).
228. SANDINI, S. *et al.* A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine. *FEMS immunology and medical microbiology* **62**, 215–224 (2011).
229. HAN, Y., KANBE, T., CHERNIAK, R. & CUTLER, J. E. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 4100–4107 (1997).

230. TOROSANTUCCI, A. *et al.* Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One* **4**, e5392 (2009).
231. RACHINI, A. *et al.* An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans* in vitro and exerts therapeutic, anticryptococcal activity in vivo. *Infect. Immun.* **75**, 5085–5094 (2007).
232. POLONELLI, L. *et al.* Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* **152**, 3175–3182 (1994).
233. MAGLIANI, W. *et al.* Protective Antifungal Yeast Killer Toxin-Like Antibodies. *CMM* **5**, 443–452 (2005).
234. MCCLELLAND, E. E., NICOLA, A. M., PRADOS-ROSALES, R. & CASADEVALL, A. Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1355–1361 (2010).
235. SCHLAGETER, A. M. & KOZEL, T. R. Opsonization of *Cryptococcus neoformans* by a family of isotype-switch variant antibodies specific for the capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **58**, 1914–1918 (1990).
236. HAN, Y. *et al.* Complement Is Essential for Protection by an IgM and an IgG3 Monoclonal Antibody Against Experimental, Hematogenously Disseminated Candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550–1557 (2001).
237. NABAVI, N. & MURPHY, J. W. Antibody-dependent natural killer cell-mediated growth inhibition of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **51**, 556–562 (1986).
238. CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L.-A. Immunoglobulins in Defense, Pathogenesis, and Therapy of Fungal Diseases. *Cell Host & Microbe* **11**, 447–456 (17 May 2012) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312812001011>.
239. XIN, H. & CUTLER, J. E. Vaccine and Monoclonal Antibody That Enhance Mouse Resistance to Candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology* **18**, 1656–1667 (2011).
240. PACHL, J. *et al.* A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42**, 1404–1413 (2006).
241. CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* **122**, 785–794 (2015).
242. BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. *Biochemistry* (W.H. Freeman, New York, 2007).
243. SUNDSTROM, P., IRWIN, M., SMITH, D. & SYPHERD, P. S. Both genes for EF-1 α in *Candida albicans* are translated. *Mol. Microbiol.* **5**, 1703–1706 (1991) 244. SUNDSTROM, P., SMITH, D. & SYPHERD, P. S. Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **172**, 2036–2045 (1990).
245. COTTRELLE, P. *et al.* Either one of the two yeast EF-1 alpha genes is required for cell viability. *Curr. Genet.* **9**, 693–697 (1985).
246. URBAN, C., SOHN, K., LOTTSPEICH, F., BRUNNER, H. & RUPP, S. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett.* **544**, 228–235 (2003).
247. ZAKIKHANY, K. *et al.* In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell. Microbiol.* **9**, 2938–2954 (2007).

248. LOPEZ, C. M. *The roles of candida albicans Gpm1p and Tef1p in immune evasion and tissue invasion of the human host* (2013).
249. DASARI, P. *et al.* Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **118**, 4946–4956 (2011).
250. ZIPFEL, P. F., WÜRZNER, R. & SKERKA, C. Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms. XIth European meeting on Complement in Human Disease. *Mol. Immunol.* **44**, 3850–3857 (2007/9) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589007002581>.
251. MERI, T. *et al.* The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect. Immun.* **72**, 6633–6641 (2004).
252. REUTER, M., CASWELL, C. C., LUKOMSKI, S. & ZIPFEL, P. F. Binding of the human complement regulators CFHR1 and factor H by streptococcal collagen-like protein 1 (Scl1) via their conserved C termini allows control of the complement cascade at multiple levels. *J. Biol. Chem.* **285**, 38473–38485 (2010).
253. PAULY, D. *et al.* A novel antibody against human properdin inhibits the alternative complement system and specifically detects properdin from blood samples. *PLoS One* **9**, e96371 (2014).
254. SONG, J. M. *et al.* Elongation factor EF-1 alpha gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 4571–4575 (1989).
255. JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins. Old proteins learning new tricks. *Trends in Genetics* **19**, 415–417 (2003).
256. VAN DEN ELSEN, J. M. H. & ISENMAN, D. E. A Crystal Structure of the Complex Between Human Complement Receptor 2 and Its Ligand C3d. *Science* **332**, 608–611 (2011).
257. CARTER, R. H., SPYCHER, M. O., NG, Y. C., HOFFMAN, R. & FEARON, D. T. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J. Immunol.* **141**, 457–463 (1988).
258. BROCKMAN, M. A., VERSCHOOR, A., ZHU, J., CARROLL, M. C. & KNIPE, D. M. Optimal long-term humoral responses to replication-defective herpes simplex virus require CD21/CD35 complement receptor expression on stromal cells. *Journal of Virology* **80**, 7111–7117 (2006).
259. LESLIE, R. G. Q. The influence of complement receptor type 1 (CD35) and decay-accelerating factor (CD55) on complement receptor type 2- (CD21) mediated alternative pathway activation by B cells. *Immunology* **97**, 371 (1999).
260. NETEA, M. G. *et al.* The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* **185**, 1483–1489 (2002).
261. MURCIANO, C., YANEZ, A., GIL, M. L. & GOZALBO, D. Both viable and killed *Candida albicans* cells induce in vitro production of TNF-alpha and IFN-gamma in murine cells through a TLR2-dependent signalling. *European cytokine network* **18**, 38–43 (2007).
262. BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 33–43 (2006).
263. ROGERS, N. C. *et al.* Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**, 507–517 (2005).
264. CROTTY, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 185–189 (2015).
265. WHIBLEY, N. *et al.* Expansion of Foxp3(+) T-cell populations by *Candida albicans* enhances both Th17-cell responses and fungal dissemination after intravenous challenge. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1069–1083 (2014).

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
Akt = PKB	Proteinkinase B
Als	Agglutinin-like sequence
AP-1	Activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
ASC	Antibody secreting cell
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
BLC	B lymphocyte chemokine
BLNK	B cell linker protein
BSA	Bovines Serumalbumin
Btk	Bruton's tyrosine kinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
C4BP	C4b-binding protein
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity-determining regions
CFHR1	Complement Factor H related protein 1
CLP	Common lymphoid progenitor cell
CR	Complement receptor
CRASP	Complement Regulator Acquiring Surface Protein
CRlg	Complement receptor of the immunoglobulin family
CWP	Cell wall protein
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage/danger associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF1α	Eukaryotic elongation factor 1 alpha
EfbC	C-terminal fragment of extracellular fibrinogen-binding protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FDC	Follicular dendritic cell
FHL-1	Factor H-like protein 1
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine-nucleotide exchange factor
Gpd2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
Gpm1	Phosphoglycerate mutase
GTP	Guanosine triphosphate
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hgt1p	High-affinity glucose transporter 1
HIV	Human immunodeficiency virus
HRP	Horseradish peroxidase
Hwp1	Hyphal cell wall protein 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Int1	Integrin-like protein 1
IP₃	Inositoltriphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kDa	Kilodalton

MAC	Membrane attack complex
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAMP	Microbe- associated molecular pattern
MASP	MBL associated serine protease
MBL	Mannose binding lectin
MHC	Major histocompatibility complex
MPP	Multipotent progenitor cell
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NHS	Normal Human Serum
PAA	Polyacrylamid
PALS	Periarteriolar lymphoid sheath
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Proteinkinase C
PLCγ2	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pra1	pH-regulated antigen 1
PRM	Pattern recognition molecule
PRR	Pattern recognition receptor
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SAP	Secreted aspartyl protease
Sbi	Second immunoglobulin-binding protein
ScI1	Streptococcal collagen-like protein 1
SCR	Short Consensus Repeat
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
Syk	Spleen tyrosine kinase
TBS	Tris-Buffered Saline
TCC	Terminal complement complex
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	Tissue plasminogen activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
uPA	Urokinase-type plasminogen activator, Urokinase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Das humane Komplementsystem.....	5
Abbildung 1.2:	B-Zell-Aktivierung.....	15
Abbildung 1.3:	Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors und –Corezeptorkomplexes	18
Abbildung 1.4:	Aufbau der Zellwand von <i>C. albicans</i>	24
Abbildung 1.5:	eEF1 α in der eukaryotischen Proteinsynthese	28
Abbildung 4.1:	Faktor H bindet an Tef1 und Tef1-gebundener Faktor H hat Cofaktoraktivität	51
Abbildung 4.2:	Komplementregulatoren binden an Tef1	52
Abbildung 4.3:	Tef1 wird auf der Zelloberfläche von <i>C. albicans</i> exprimiert	54
Abbildung 4.4:	Tef1 wird sezerniert und bindet an die Zelloberfläche von <i>C. albicans</i>	55
Abbildung 4.5:	Tef1 vermittelt die Bindung von Komplementregulatoren an <i>C. albicans</i> ...	57
Abbildung 4.6:	An die Oberfläche von <i>C. albicans</i> rekrutiertes Plasmin schädigt Endothelzellen.....	58
Abbildung 4.7:	Tef1 vermittelt Resistenz gegen Komplement-vermittelte Opsonisierung und Phagozytose	60
Abbildung 4.8:	Tef1 bindet nicht an C3b, jedoch an dessen Abbauprodukte C3dg und C3d	61
Abbildung 4.9:	Tef1 beeinflusst nicht die Bindung von C3d an CR2.....	62
Abbildung 4.10:	Tef1 bindet an CR2. Die Bindungsregion liegt in den SCRs 1-2	63
Abbildung 4.11:	Tef1 bindet an Raji-Zellen via CR2.....	64
Abbildung 4.12:	Tef1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von Raji-Zellen	65
Abbildung 4.13:	Tef1 bindet an primäre humane Leukozyten	67
Abbildung 4.14:	Tef1 induziert die Produktion von Zytokinen in PBMCs	68
Abbildung 4.15:	Tef1 verstärkt die Differenzierung von B-Zellen innerhalb von PBMCs.....	71
Abbildung 4.16:	Tef1 bindet an primäre B-Zellen via CR2	72
Abbildung 4.17:	Tef1 induziert die Produktion von IL-10 in B-Zellen	73
Abbildung 4.18:	Tef1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen.....	75
Abbildung 4.19:	Tef1 induziert die Differenzierung von regulatorischen Plasmablasten.....	78
Abbildung 4.20:	Tef1-induzierte B-Zellen inhibieren die T-Zell-Proliferation	79
Abbildung 5.1:	Zusammenfassung der immunevasiven Mechanismen von Tef1	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Verwendete Chemikalien	34
Tabelle 3.2:	Verwendete Antikörper/-seren.....	36
Tabelle 3.3:	Verwendete Stämme.....	39

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit vermerkt.

Alle Personen, die mich bei der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind von mir benannt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Zudem erhielten von mir keine Dritten unmittelbare oder mittelbar geldwerte Leistungen, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Von mir wurde keine identische oder abgeänderte Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 13.12.2016

Justus Linden

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Justus Linden
Geburtsdatum / -ort	27.07.1987, Engelskirchen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig



Bildungsweg

Seit 01.10.2013	Friedrich-Schiller-Universität, Jena Promotionsstudium im Bereich Immunbiologie Promotionsstipendium der <i>International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions</i> (ILRS) Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-Institut Dissertationsprojekt: „ <i>Immune evasion of Candida albicans</i> “ in der Abteilung Infektionsbiologie bei Prof. Dr. Peter Zipfel
01.10.2010 – 30.11.2012	Friedrich-Schiller-Universität, Jena Studiengang: Molecular Medicine Masterarbeit: „ <i>Influence of the chemokine Fractalkine (CX₃CL1) on cultured dorsal root ganglia (DRG) neurons</i> “ Abschluss: Master of Science (1,2)
01.10.2007 – 30.09.2010	RWTH Aachen Studiengang: Biotechnologie/Molekulare Biotechnologie Bachelorarbeit: „ <i>Untersuchung potentieller Zielgene von SFRP1 in murinem Brustgewebe</i> “ Abschluss: Bachelor of Science (1,4)
1998 – 2007	Städtisches Gymnasium Grotenbach, Gummersbach Abschluss: Abitur (1,3)

Übersicht der Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikationen

Vorträge

MiCom 2014, 4th international student conference on microbial communication, April 2014, Jena

Titel: The role of Tef1 for immune evasion of *Candida albicans*

7th ILRS Symposium, Mai 2014, Jena

Titel: Translation elongation factor 1 alpha (Tef1) acquires Complement regulators to the surface of *C. albicans*

Ausgezeichnet mit einem Vortragspreis

49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. und 1st International Symposium of the CRC/Transregio FungiNet, September 2015, Jena

Titel: CRASP11 recruits soluble human complement regulators to the surface of *Candida albicans*

JAHRESTAGUNG 2016 der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), März 2016, Jena

Titel: CRASP11 recruits soluble human complement regulators and mediates complement evasion of *Candida albicans*

Poster

MiCom 2015, 5th international student conference on microbial communication, April 2015, Jena

Titel: *Candida albicans* CRASP11 is a new immune and complement evasion protein

8th ILRS Symposium, Mai 2015, Jena

Titel: The role of CRASP11 for Complement evasion of *Candida albicans*

Ausgezeichnet mit einem Posterpreis

Joint Symposium ILRS/GRK1870, Mai 2016, Wittenberg

Titel: CRASP11 is a novel complement evasion protein of *Candida albicans*

Publikationen

Linden J, Lopez C, Reza MJ, Dasari P, Miramon P, Hube B, Skerka C and Zipfel PF

Tef1 is a new moonlighting and immune evasion protein of the human pathogenic fungus *Candida albicans*

in Vorbereitung

Linden J, Beyersdorf N, Skerka C and Zipfel PF

Candida albicans Tef1 binds to human B cells via CR2 and induces a regulatory phenotype

in Vorbereitung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Peter Zipfel sowie Frau Prof. Dr. Christine Skerka, die mir die Möglichkeit gaben, in der Abteilung für Infektionsbiologie mein Dissertationsprojekt zu entwickeln, mir ein interessantes und vielschichtiges Thema bereitstellten und in zahllosen Gesprächen stets konstruktiv an der Entwicklung der Dissertation mitwirkten. Ferner danke ich Herrn PD Dr. Niklas Beyersdorf für den fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch, der die Entwicklung dieser Dissertation maßgeblich beeinflusst hat.

Bei der *International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions* (ILRS) bedanke ich mich für die finanzielle Förderung meiner Arbeit in Form eines dreijährigen Promotionsstipendiums. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Christine Vogler für ihre stets freundliche und hilfsbereite Art und Hilfe bei zahlreichen organisatorischen Fragen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Infektionsbiologie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, den ausgeprägten Gemeinschaftssinn und die omnipräsente Hilfsbereitschaft in allen erdenklichen Situationen. Mein Dank gilt insbesondere meinen Laborkameraden Dr. Prasad Dasari, Dr. Malik Johid Reza und Naile Koleci für den besonderen Geist von Labor 006. Hervorheben möchte ich weiterhin Dr. Hans-Martin Dahse für die Teilhabe an seinem reichhaltigen Erfahrungsschatz, Andrea Hartmann für die Hilfe in manch ausweglos erscheinender Situation, sowie Nadine Reiher und Anika Westphal für zahlreiche anregende Gespräche. Ganz besonderer Dank gilt Christian Meinel, mit dem ich das Privileg hatte, in den vergangenen Jahren das Labor zu teilen. Mit seiner Scharfsinnigkeit, Arbeitsphilosophie und herausragender Akkuratessse ist er mir Vorbild und Inspiration gewesen. Darüber hinaus durfte ich ihn als gradlinigen und verlässlichen, aber auch empathischen und humorvollen Menschen kennenlernen.

Ich danke Alex, Andre, Emerald, Philip, Ramona, Sarah und Yuchen, mit denen ich über die Arbeit hinaus manche schöne Zeit verbracht habe, was einen willkommenen Ausgleich zur Arbeit im Labor darstellte.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung und insbesondere während der Promotion unterstützt und gefördert haben. Besonderes danke ich meinen Großeltern, die meinen Werdegang stets wohlwollend begleitet haben und mir stets eine Quelle der Kraft und Zuversicht gewesen sind.

Abschließender und nicht zu ermessender Dank gilt meiner Freundin Christina Beer, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre. Ihre Hartnäckigkeit, ihr Fleiß und ihr Durchhaltevermögen haben mich vielfach inspiriert und waren mir ein Ansporn, meine Ziele nie aus den Augen zu verlieren. Ihre Geduld und Zuneigung halfen mir, manche Rückschläge zu überwinden. Nicht zuletzt hat sie mir durch zahlreiche Gespräche neue wissenschaftliche Perspektiven eröffnet und mich zur Reflexion angeregt.